



Implementação de um Método para a Determinação de Hidrocarbonetos Alifáticos Saturados em Óleo de Girassol por Cromatografia Gasosa

Ana Catarina do Carmo Correia Rodrigues Machado

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Professor Doutor Miguel Mourato

Co-orientador: Engenheira Paula Vasconcelos

Júri:

Presidente: – Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

- Vogais: – Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
- Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
 - Licenciada Paula Maria Machado George de Vasconcelos de Azevedo e Castro, Técnica Superior do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, na qualidade de especialista.

Lisboa, 2011

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Doutor Miguel Mourato e à Professora Doutora Luísa Louro Martins pela oportunidade que me deram de realizar este trabalho, pela disponibilidade e apoio constantes ao longo do desenvolvimento do mesmo, pelas sugestões e também pela forma muito simpática como sempre me acolheram.

À Engenheira Paula Vasconcelos, co-orientadora deste trabalho, pela maneira como me acolheu no Laboratório de Estudos Técnicos e pela disponibilidade e abertura com que me cedeu todas as informações necessárias para o desenvolvimento deste trabalho, contribuindo com valorosas críticas.

A todas as pessoas que trabalham no Laboratório de Estudos Técnicos, mais conhecido como Laboratório de Azeites do Instituto Superior de Agronomia, nomeadamente à Engenheira Helena Alegre pelo auxílio prestado durante a execução do trabalho prático e pela disponibilidade para me ajudar nas mais variadas situações.

A todos aqueles, família, amigos e colegas, que directa ou indirectamente, deram o seu contributo, encorajando-me para que este trabalho tivesse sido possível. Agradeço especialmente e carinhosamente à Mainha e à NãNã, que muito me apoiaram, dando-me ânimo nos momentos mais difíceis da realização deste trabalho.

Aos meus pais e à NãNã um agradecimento muito especial, pois a eles devo tudo o que sou e tudo o que tenho, incluindo este curso.

A todos, o meu muito obrigada.

Resumo

O óleo mineral é um subproduto derivado da destilação do petróleo, aplicável a nível cosmético, farmacêutico e alimentar, usado como aditivo alimentar, quando de grau próprio para tal. No entanto, pode também ser considerado uma contaminação, especialmente importante no óleo de girassol devido ao episódio das 100.000 toneladas de óleo de girassol Ucraniano altamente contaminado. Este trabalho tem como objectivo a implementação de um método para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados em óleo de girassol por cromatografia gasosa em coluna capilar, com injeção *on column* e detector *FID*. Para tal foram avaliados parâmetros como linearidade, gama de trabalho, limiares analíticos, precisão, exactidão e robustez do método. Os resultados mostram que o método é linear para uma gama de trabalho entre 15 e 60 mg.kg⁻¹, com um limite de repetibilidade de 6,11 mg.kg⁻¹ e uma variabilidade de resultados associados ao método de 0,48 mg.kg⁻¹. O método permite detectar e quantificar o analito a partir de 21 mg.kg⁻¹ e 24 mg.kg⁻¹, respectivamente. Face aos resultados obtidos em ensaios de recuperação e aos *Z-score* de 0,5 e 0,04 obtidos em ensaios interlaboratoriais, o método é exacto. Verifica-se também a robustez do mesmo, sendo um método sensível ao modo de integração dos resultados.

Palavras-chave: hidrocarbonetos alifáticos saturados, óleo mineral, óleo de girassol, cromatografia gasosa.

Abstract

Mineral oil is a by-product derived from petroleum distillation, applicable in the areas of cosmetics, pharmaceuticals and food, used as food additive when in the proper grade of purity for this propose. However, it can also be considered a contaminant, especially important in sunflower oil, due to the episode of the 100.000 tons of highly contaminated Ukrainian sunflower oil. This experimental work aims at implementing a method for the determination of saturated aliphatic hydrocarbons in sunflower oil by capillary gas chromatography with on column injection and FID detector. For such purpose parameters like linearity, working range, thresholds, precision, accuracy and robustness of the method were evaluated. The results show that the method is linear in the range between 15 and 60 mg.kg⁻¹, with a repeatability limit of 6,11 mg.kg⁻¹ and a variability of results obtained by this method of 0,48 mg.kg⁻¹. The method allows to detect and quantify the analyte from 21 mg.kg⁻¹ and 24 mg.kg⁻¹, respectively. Considering the results obtained in recovery tests and Z-score of 0,5 and 0,04 obtained in inter-laboratory tests, the method is accurate. The robustness of this method is also verified, although it is sensible to the way the integration is performed.

Key - words: saturated aliphatic hydrocarbons, mineral oil, sunflower oil, gas chromatography.

Extended Abstract

Mineral oil is a by-product derived from the distillation of petroleum, chemically inert and composed essentially by alkanes with between 15 and 40 carbons and cyclic paraffins, that can be found in a great variety of food, like nuts, grains of coffee, rice, bread and bakery products. The origin of this contamination is extremely diversified, highlighting the fact that mineral oil can be used as lubricant of fibers that make up food packaging, in pesticide formulation and as release agent in the area of bakery and pastry. This mixture of compounds can also be used as food additives as long as it is a white mineral oil, that is, a highly refined mineral oil from which aromatic hydrocarbons, harmful to human health, have been removed. Even so, the contact of mineral oil with human body can be accomplished not only by food products, but also through cosmetics, pharmaceuticals and due to pollution. However, the interaction of this set of compounds with human body has never been considered a health hazard, until the incident of the 100,000 tons of Ukrainian sunflower oil, crude and refined, contaminated with high concentrations of mineral oil. From this moment, it was established in the European Union that there was a need to control the quality of vegetable oils, especially sunflower oil imported from Ukraine, instituting that a control of the amount of saturated aliphatic hydrocarbons especially of mineral origin would have to be made, which may not exceed a maximum level of 50 mg.kg^{-1} , both for refined and crude sunflower oil.

This experimental work aims at implementing an internal method for the determination of saturated aliphatic hydrocarbons in sunflower oil by capillary gas chromatography with on column injection and FID detector. In this method, a pre-treatment of the sample in column chromatography is performed, using silica gel treated with silver nitrate and as eluent chromatography-grade n-hexane. For validation purposes some parameters were evaluated, including working range and linearity, analytical thresholds – limits of detection and quantification – precision through repeatability and intermediate precision, accuracy through recovery experiments and inter-laboratory tests as there are no certified reference materials for the analysis of mineral oil and the robustness of the method. The results obtained in these experiments show that the method is linear in the range between 15 and 60 mg.kg^{-1} and has a sensitivity of $0,0309 \text{ kg.mg}^{-1}$. The repeatability limit, calculated on the basis of an assay in repeatability conditions is $6,11 \text{ mg.kg}^{-1}$ and the variability of results associated to the method, calculated in the basis of an assay in condition of intermediate precision with variation of the day of analysis, is $0,48 \text{ mg.kg}^{-1}$. The method allows detection of the analyte from 21 mg.kg^{-1} , but quantification can only be accomplished from 24 mg.kg^{-1} . Given the results obtained in recovery experiments with recovery rates from 90 % to 110 % in an

assessment carried out with samples of sunflower and soybean oils, both crude and refined, and the Z-score of 0.5 for a sample of sunflower oil and 0.04 for a soybean oil, obtained in inter-laboratory assays, the method is considered accurate. The robustness of the method is also verified, however being sensible to the way the integration is performed, it is important to define objective criteria to successfully complete this stage of the process. To minimize the possibility of introducing errors in the results, originating from the integration mode, there is a need for standardization of methods used to perform this determination, which can be achieved with the implementation of ISO guidelines that are still awaiting approval. In addition, it was confirmed the need to use chromatography-grade n-hexane instead just analytical purity, as it introduces a contamination with mineral oil in the sample that distorts the results upwards. In comparing the method used in this experimental work with ISO guidelines, which will be the basis for this determination in the future, it was found that there are no significant differences in the results obtained. It was verified, thus, through validation that this method allows the attainment of trustworthy results for the determination of saturated aliphatic hydrocarbons of mineral origin in sunflower oil, taking into account the results of the assessment of objective criteria that include the validation of a test method. That is, it was verified that this method allows determining whether a specific sample is within the legal limits in terms of food quality, thus allowing its commercialization. Although the method is specific to sunflower oil, there is also the possibility of applying it to other vegetable oils such as soybean oil, which was tested in this work in inter-laboratory trials and recovery tests, or even applicable to another types of food.

As mineral oil, besides being a major contamination of human body – accounting for the accumulation of approximately 1 g of this mixture of compounds in human body fat and in extreme cases of 10 g – is also one of the most common contaminants found in food and usually with unknown origin, its control is essential, especially in food, in order to control the quality of ingested food. The inspection of this type of contamination becomes especially important since this can happen with white mineral oil, also called food grade mineral oil or technical grade oil, which is a mineral oil containing high amounts of aromatic hydrocarbons, used for technical work as lubrication and equipment maintenance and therefore not fitted for human consumption, what could adversely affect health of consumers, depending on the degree of contamination.

Key - words: saturated aliphatic hydrocarbons, mineral oil, sunflower oil, gas chromatography.

Índice

Índice de Figuras	viii
Índice de Quadros	ix
Lista de Abreviaturas	x
I. Enquadramento do tema	1
II. Introdução	2
II.1. Óleos e gorduras na indústria alimentar	2
II.2. Importância nutricional dos óleos vegetais	3
II.3. Áreas de aplicação dos óleos vegetais	6
II.4. O girassol	8
II.4.1. A cultura do girassol	8
II.4.2. Óleo de girassol	9
II.5. A soja	12
II.5.1. A cultura da soja	12
II.5.2. Óleo de soja	14
II.6. Modo de produção de um óleo vegetal	17
II.7. Óleo mineral	19
II.7.1. Aplicações do óleo mineral	20
II.7.2. Óleo mineral em alimentos	20
II.7.3. Toxicidade do óleo mineral	22
II.8. Cromatografia gasosa	25
II.9. Validação de um método analítico	29
III. Parte experimental	39
III.1. Materiais e reagentes	39
III.1.1. Materiais	39
III.1.2. Reagentes	39
III.2. Procedimento experimental	40
III.2.1. Preparação de gel de sílica prateado	40
III.2.2. Preparação da coluna cromatográfica de pré-tratamento	40
III.2.3. Fraccionamento do óleo	41
III.2.4. Separação cromatográfica	41
III.2.5. Determinações quantitativas	42
III.3. Análises efectuadas	43

III.3.1. Limiares analíticos	43
III.3.2. Curva de calibração	44
III.3.3. Repetibilidade	44
III.3.4. Exactidão	44
III.3.5. Robustez	44
IV. Resultados e discussão	46
IV.1. Curva de calibração e sensibilidade	47
IV.2. Limiares analíticos	51
IV.3. Precisão	56
IV.3.1. Repetibilidade	57
IV.3.2. Reprodutibilidade	60
IV.3.3. Precisão Intermédia	61
IV.4. Exactidão	63
IV.4.1. Materiais de Referência Certificados (MRC)	63
IV.4.2. Comparações interlaboratoriais	63
IV.4.3. Ensaio de recuperação	67
IV.5. Robustez	68
V. Propostas para trabalho futuro	77
VI. Conclusões	78
VII. Referências bibliográficas	81
VIII. Anexos	87

Índice de Figuras

Figura 1: Variação da produção mundial de óleos vegetais (em milhões de toneladas) ao longo de seis anos.	3
Figura 2: Esquema representativo da estrutura de um triglicérido.	4
Figura 3: Evolução da produção mundial dos principais óleos vegetais, ao longo de 35 anos.	7
Figura 4: Produção mundial de girassol em kg/ha.	8
Figura 5: Produção nacional de girassol.	9
Figura 6: Principais países de produção e consumo de óleo de girassol.	10
Figura 7: Principais países produtores de soja (dados de 2009/2010).	13
Figura 8: Principais produtores e consumidores de óleo de soja (dados de 2009/2010).	15
Figura 9: Esquematização da estrutura de um cromatógrafo gasoso.	26
Figura 10: Esquematização da estrutura de um detector de ionização por chama.	28
Figura 11: Rampa de temperatura do forno, na análise cromatográfica de óleo mineral.	42
Figura 12: Correlação entre concentração de padrões de parafina e sinal obtido em termos de área correspondente a óleo mineral.	48
Figura 13: Correlação entre concentração de padrões de parafina e área normalizada correspondente a óleo mineral.	48
Figura 14: Exemplificação da integração da banda larga correspondente a óleo mineral num cromatograma referente a óleo de girassol refinado.	73
Figura 15: Exemplificação da integração pico a pico dos hidrocarbonetos alifáticos normais num óleo para o mesmo óleo de girassol refinado apresentado na Figura 13.	74

Índice de Quadros

Quadro I: Composição genérica de óleos alimentares.	4
Quadro II: Teor de ácidos gordos de diversos óleos vegetais.	5
Quadro III: Composição nutricional média do óleo de girassol (valores por 100 g).	11
Quadro IV: Comparação da composição em ácidos gordos de óleo de girassol tradicional e óleo de girassol com elevado teor em ácido oleico.	12
Quadro V: Composição nutricional média do óleo de soja (valores por 100 g).	16
Quadro VI: Composição típica em ácidos gordos do óleo de soja.	16
Quadro VII: Parâmetros de validação a avaliar conforme o tipo de ensaio.	30
Quadro VIII: Compilação dos resultados de avaliação de qualidade do método usado.	51
Quadro IX: Resultados obtidos (em mg.kg ⁻¹) nos dez replicados para determinação dos limiares analíticos.	52
Quadro X: Súmula dos valores obtidos para os limites de detecção e de quantificação pelos dois métodos de cálculo.	54
Quadro XI: Resultados obtidos (mg.kg ⁻¹) na determinação da repetibilidade.	57
Quadro XII: Resultados obtidos nos dez ensaios para a avaliação da precisão intermédia.	61
Quadro XIII: Resultados obtidos (mg.kg ⁻¹) nos ensaios interlaboratoriais, para as amostras de óleo de girassol refinado e óleo de soja bruto.	64
Quadro XIV: Resultados obtidos (mg.kg ⁻¹) pelo LET, na análise de amostras de óleo de girassol refinado e óleo de soja bruto, englobadas no ensaio interlaboratorial.	66
Quadro XV: Resultados obtidos nos ensaios de recuperação, para o estudo da exactidão do método.	68
Quadro XVI: Resultados dos ensaios para testar a necessidade de filtração de amostras com impurezas.	70
Quadro XVII: Comparação de sistemas de integração através da inspecção de resultados obtidos para a análise dos limiares analíticos.	72
Quadro XVIII: Resultados da comparação entre métodos.	75

Lista de Abreviaturas

ADI – *Admissible Dially Intake* – Dose Diária de Ingestão Aceitável

AVC – Acidente Vascular Cerebral

EFSA – *European Food Safety Authority*

FDA – *Food and Drug Administration*

FID - *Flame Ionization Detector* - Detector de Ionização por Chama

GC - *Gas Chromatography* - Cromatografia Gasosa

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IRMM – *Institute for Reference Materials and Measurements*

JECFA – *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*

LC – *Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida

LD – Limite de Detecção

LDL – *Low Density Lipoprotein*

LET – Laboratório de Estudos Técnicos

LQ – Limite de Quantificação

MRC – Materiais de Referência Certificados

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

NOAEL – *No Observed Adverse Effect Level*

SE – *Solvent Evaporation* – Evaporação de solvente

VLDL – *Very Low Density Lipoprotein*

I. Enquadramento do tema

Os hidrocarbonetos de origem mineral - comumente designados por óleo mineral - podem ser encontrados numa grande variedade de alimentos, desde nozes, grãos de café, arroz, pão e produtos de padaria e ainda nos vegetais, sendo a proveniência desta contaminação extremamente diversificada, destacando-se o facto de o óleo mineral ser usado como lubrificante de fibras que compõem embalagens para alimentos, em formulações de pesticidas e ainda como agente antiaderente no ramo da padaria e pastelaria. Ainda assim, o contacto do óleo mineral com o organismo humano pode ser feito não só por via de produtos alimentares, mas também através da cosmética ou produtos farmacêuticos ou ainda devido à poluição. No entanto este tipo de contaminação nunca havia sido considerado perigoso para a saúde, até ao incidente das toneladas de óleo de girassol, proveniente da Ucrânia, contaminado com elevadas concentrações de óleo mineral (em 2008), existindo mesmo, óleo de girassol bruto contaminado com 7000 mg.kg^{-1} e óleo de girassol refinado com 2000 mg.kg^{-1} de contaminação com esta mistura de compostos. A partir deste momento, estabeleceu-se na União Europeia que havia necessidade de controlo da qualidade dos óleos vegetais, especialmente do óleo de girassol importando da Ucrânia, instituindo-se que deveria ser feito um controlo à quantidade de hidrocarbonetos alifáticos saturados no óleo de girassol, não devendo estes exceder um nível máximo de 50 mg.kg^{-1} , tanto para óleo de girassol refinado como bruto.

Assim se justifica o aparecimento de métodos de ensaio para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados em óleos vegetais, com o intuito de controlar a qualidade dos óleos que a Europa importa, visto que o consumo de óleos vegetais tem aumentado entre a população, que procura uma alimentação mais saudável.

II. Introdução

II.1. Óleos e gorduras na indústria alimentar

Os óleos e gorduras são parte significativa dum vasto grupo de compostos designados genericamente lípidos - cuja característica comum é o facto de serem geralmente solúveis em solventes orgânicos e insolúveis, ou fracamente solúveis, em água - podendo ser encontrados em células de origem animal, vegetal e microbiana. A distinção entre óleos ou gorduras líquidas e gorduras faz-se pelo facto de serem líquidos ou sólidos à temperatura ambiente, respectivamente. Estes compostos são conjuntamente com as proteínas e glúcidos, os principais componentes estruturais de todas as células vivas, sendo a mais concentrada fonte de energia (da sua oxidação resultam 9 kcal/g, enquanto da oxidação das proteínas e dos glúcidos resultam apenas 4 kcal/g), fonte de ácidos gordos essenciais (ácido linoleico - ómega 6 - e ácido linolénico - ómega 3) e vitaminas lipossolúveis (vitamina A, D, E, K), o que lhes confere grande importância nutricional (Lopes, 2000). São ingeridas como gorduras visíveis - manteiga, banha, óleos de tempero, entre outros - ou como constituintes dos alimentos, por exemplo, no leite, queijo ou carne. Contribuem para o sabor e palatabilidade, *flavour* (como precursores de aroma) e textura dos alimentos e aumentam a sensação de saciedade, após a sua ingestão (Lopes, 2000).

Os países ocidentais utilizaram durante muitos séculos essencialmente gorduras animais para suprir as suas necessidades em termos de gordura, existindo, no entanto, algumas excepções, em que eram utilizados óleos produzidos localmente, podendo citar-se o exemplo do azeite nos países mediterrânicos e da colza em França e na Polónia, sendo que, a manteiga e o sebo se mantiveram como as gorduras mais importantes na Europa até meados do século XIX. Com a introdução, no final desse século, da prensagem hidráulica e a extracção por solventes, os óleos vegetais começaram a ganhar vantagem. Para além disto, aquando das conquistas coloniais, as oleaginosas tropicais, nomeadamente, o amendoim, começaram a chegar à Europa a preços muito baixos, fazendo concorrências aos produtos nacionais. No entanto, no final da Segunda Guerra Mundial, como consequência do aumento do preço do amendoim no mercado internacional, o Ocidente começou a desenvolver algumas culturas oleaginosas: o girassol em França e no leste da Europa; a colza no Canadá, França, Polónia, Alemanha e Suécia; e paralelamente, nos EUA começou a desenvolver-se a cultura da soja (Lopes, 2000).

Actualmente existe no mercado uma grande variedade de óleos vegetais, tendo-se verificado um aumento da produção dos mesmos ao longo dos últimos anos - de aproximadamente 119 milhões de toneladas em 2005/06 para aproximadamente 147

milhões de toneladas em 2010/11 (Carvalho, 2010). Ao nível dos óleos vegetais destacam-se os de Palma, Soja, Colza e Girassol, como os de maior produção mundial (Figura 1).

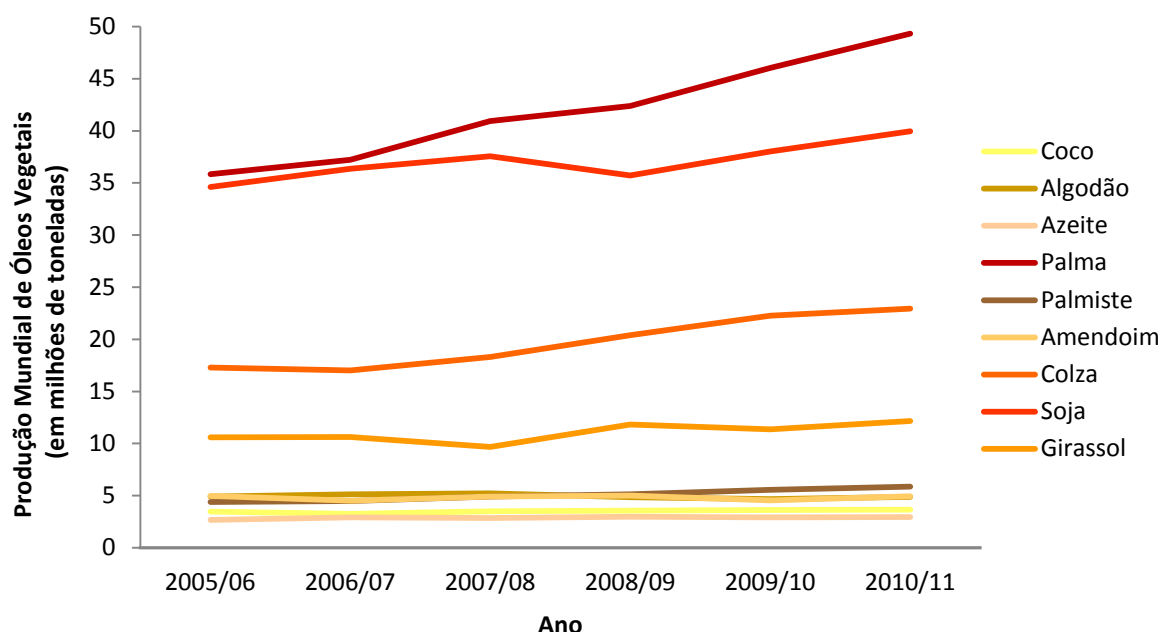


Figura 1: Variação da produção mundial de óleos vegetais (em milhões de toneladas) ao longo de seis anos.
Adaptado de Carvalho (2010).

II.2. Importância nutricional dos óleos vegetais

Quimicamente um óleo é composto por duas frações (Quadro I):

- Fracção saponificável (representa cerca de 99 % de um óleo): insolúvel em água, constituída essencialmente por triglicéridos, mas também por mono e diglicéridos resultantes da hidrólise dos primeiros. Contém ainda ácidos gordos livres, fosfatídeos, glucósidos e pigmentos verdes – que contêm clorofila e produtos resultantes da sua decomposição. Muitas das características físicas, químicas e metabólicas de um óleo dependem da composição desta fracção (Lopes, 2000; Silva, 2001);
- Fracção insaponificável (representa entre 0,5 e 1,5 % de um óleo): solúvel em água, constituída por componentes menores, os quais compreendem hidrocarbonetos, esteróis, ceras, álcoois, substâncias corantes e aromáticas, vitaminas, tocoferóis e polifenóis. Esta é a fracção responsável pelo valor biológico, nutricional e pela resistência à oxidação de um óleo. A sua concentração depende do tipo de óleo, no entanto, esta fracção é sempre maior no óleo bruto do que no refinado,

independentemente do tipo de óleo e, portanto, diminui com o processamento (Lopes, 2000; Silva, 2001).

Quadro I: Composição genérica de óleos alimentares.

Componente	%	Componente	ppm
Triglicéridos	90 – 99	Tocoferóis	150 – 2000
Diglicéridos	0,0 – 0,2	Tocotrienóis	0,0 – 1500
Monoglicéridos	0,0 – 0,2	Fenóis	0,0 – 50
Ácidos Gordos Livres	0,2 – 9,5	Clorofilas e derivados	0,0 – 20
Fosfolípidos	0,01 – 0,1	Carotenóides	0,0 – 500
Esteróis	0,4 – 2,0	Metais	0,01 – 2,5
Humidade	0,0 – 0,1	Materiais oxidados	0,01 – 2,5
		Proteínas	0,0 – 0,01
		Gomas	0,0 – 2,0

Fonte: Lopes, 2000.

Os triglicéridos – compostos em que cada grupo hidroxilo do glicerol é esterificado com uma molécula de um ácido gordo (Figura 2), num processo que é controlado pelo metabolismo da planta - são compostos especialmente importantes no que respeita às propriedades físicas, químicas e biológicas dos óleos, não só porque são os componentes maioritários dos mesmos, mas também porque a posição e o tipo de ácidos gordos num triglicérido vão influenciar essas mesmas propriedades.

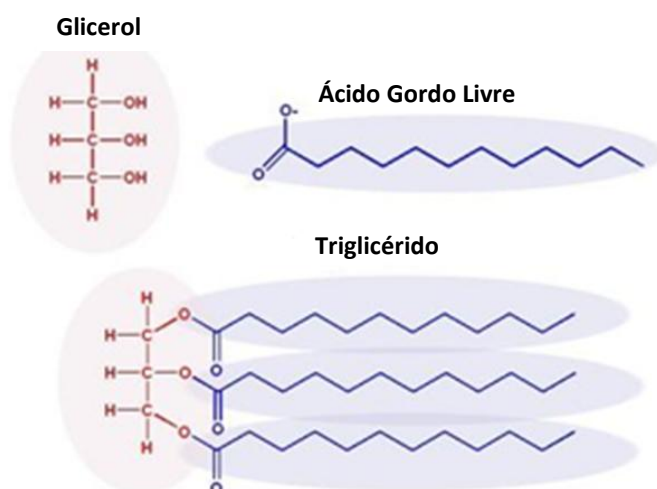


Figura 2: Esquema representativo da estrutura de um triglicérido.

Fonte: <http://www.medicinapreventiva.com.ve/laboratorio/trigliceridos.htm>

Os ácidos gordos que constituem os triglicéridos dos óleos são predominantemente ácidos alifáticos monocarboxílicos de cadeia linear e número par de átomos de carbono, de C4 a C24, podendo estes ser saturados – quando possuem apenas ligações simples entre os átomos de carbono da cadeia carbonada - monoinsaturados ou polinsaturados – quando possuem uma ou mais ligações duplas na cadeia carbonada, respectivamente. Dentre os ácidos gordos presentes em óleos vegetais destacam-se o ácido oleico (C18:1) como ácido gordo monoinsaturado, o ácido linoleico (C18:2) como polinsaturado e o ácido palmítico (C16:0), na categoria dos ácidos gordos saturados. O Quadro II apresenta a composição média em ácidos gordos de alguns óleos vegetais.

Quadro II: Teor de ácidos gordos de diversos óleos vegetais.

Óleos	Ácidos gordos saturados	Ácidos Gordos Monoinsaturados	Ácidos Gordos Polinsaturados	
			Ácido Linoleico	Ácido Linolénico
Colza	6 %	58 %	26 %	10 %
Girassol	11 %	2 %	69 %	-
Palma	48 %	40 %	10 %	-
Azeite	14 %	77 %	8 %	< 1 %
Soja	15 %	24 %	54 %	7 %

Adaptado de Reda & Carneiro (2007).

Os ácidos gordos desempenham diversas funções ao nível da nutrição humana, podendo ocasionar, consoante o tipo de ácido gordo em questão, efeitos benéficos ou prejudiciais para a saúde. O aumento de ácidos gordos saturados na dieta induz a hipercolesterolemia, ou seja, um aumento do colesterol total e da fracção aterogénica (colesterol – LDL), enquanto os ácidos gordos polinsaturados possuem o efeito contrário – redução da hipercolesterolemia. Há várias explicações sobre os mecanismos pelos quais os ácidos gordos afectam as concentrações de colesterol plasmático, podendo referir-se a mudança na composição das lipoproteínas, alterações na produção de LDL (*Low Density Lipoprotein*) e VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) pelo fígado e ainda alteração da actividade dos receptores da LDL (Moraes & Colla, 2006).

De entre os ácidos gordos convém salientar o papel de dois ácidos gordos essenciais - o ácido linoleico e o ácido linolénico. Relativamente ao ácido linoleico, o principal ácido gordo ómega 6, possui um papel importante no organismo humano, visto que, num ser humano saudável será convertido em ácido gama-linolénico, sendo este posteriormente convertido

em ácido araquidónico, que através da via metabólica da cascata do mesmo ácido, produz eicosanóides, importantes compostos hormonais que desempenham um papel de extrema importância em muitas funções corporais, tais como reacção anti-inflamatória e participação na estrutura das membranas celulares - influenciando a viscosidade sanguínea, permeabilidade dos vasos, acção antiagregadora e pressão arterial (Guiné & Henriques, 2011). Convém ainda salientar o papel do ácido linolénico, a partir do qual são sintetizados, no organismo humano, os ácidos gordos de cadeia longa da família ómega 3, sendo este ácido um precursor primordial das prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, substâncias que possuem actividade anti-inflamatória, anti-coagulante, vasodilatadora e anti-agregante (Moraes & Colla, 2006). Além do papel nutricional na dieta, os ácidos gordos ómega 3 podem ajudar a prevenir uma variedade de doenças, incluindo doenças do coração, cancro, artrite, depressão e Alzheimer. As deficiências de ómega 3 estão relacionadas com a diminuição da memória e capacidades mentais, baixa visão, maior tendência para a formação de coágulos sanguíneos, diminuição da imunidade, entre outros (Guiné & Henriques, 2011). É importante salientar que é necessário um equilíbrio apropriado entre os dois tipos de ácidos gordos essenciais – ómega 3 e ómega 6 – visto que estes trabalham em conjunto com o objectivo da promoção da saúde. A deficiência ou o desequilíbrio no fornecimento destes dois ácidos gordos ao organismo está relacionado com graves condições de saúde, de que são exemplo, ataque cardíaco, cancro, asma, lúpus, depressão, envelhecimento acelerado, acidente vascular cerebral (AVC), hiperactividade e síndrome de défice de atenção (Guiné & Henriques, 2011).

Relativamente aos ácidos gordos monoinsaturados, para além de serem eficazes redutores de colesterol, estes possuem também outros efeitos benéficos, tais como a diminuição da oxidação do colesterol LDL e melhoria da palatabilidade dos alimentos (Moraes & Colla, 2006).

Assim, as recomendações dietéticas avançam no sentido de diminuir as gorduras saturadas numa dieta, em favor das mono e polinsaturadas, sem que estas últimas ultrapassem 10 % das calorias totais (Moraes & Colla, 2006).

II.3. Áreas de aplicação dos óleos vegetais

Um óleo possui diversas aplicações ao nível alimentar, das quais se podem destacar o uso para fins culinários, fritura - quer doméstica, quer industrial - panificação, produção de margarinas, óleo de tempero, entre outros. Os critérios de escolha de um óleo alimentar

para determinada aplicação estão intimamente relacionados com a mesma: aroma e textura do produto onde o óleo seleccionado vai ser utilizado, gosto residual que deixa após a sua ingestão, estabilidade aromática, disponibilidade no mercado, custo, necessidades nutricionais específicas e ainda requisitos explícitos do consumidor alvo. De entre os factores mencionados tem-se verificado uma predominância da preocupação em termos nutricionais - optando-se sempre que possível, em termos das características desejadas para o produto final, por óleos com baixo teor em gordura saturada - e ainda em termos de custos e disponibilidade no mercado (Lopes, 2000).

Convém ainda salientar que as especificações para óleos alimentares têm sofrido alterações ao longo do tempo, especialmente devido ao desenvolvimento de técnicas analíticas que permitem conhecimentos mais detalhados ao nível da qualidade nutricional e funcional dos mesmos. Verifica-se que os factores que actualmente mais importância possuem ao nível das características de um óleo alimentar são o facto de ser totalmente de origem vegetal, rico em ácidos gordos polinsaturados e pobre em saturados, virtualmente livre de ácidos gordos *trans*, sem adição de óleos hidrogenados e de corantes (Lopes, 2000).

Neste trabalho pretende-se implementar um método para avaliar um dos parâmetros de qualidade associados ao óleo de girassol – determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados, mais comumente designada por contaminação com óleo mineral - e ainda extrapolar algumas conclusões para o óleo vegetal que se manteve durante muitos anos como o de maior produção e consumo a nível mundial – óleo de soja (Figura 3).

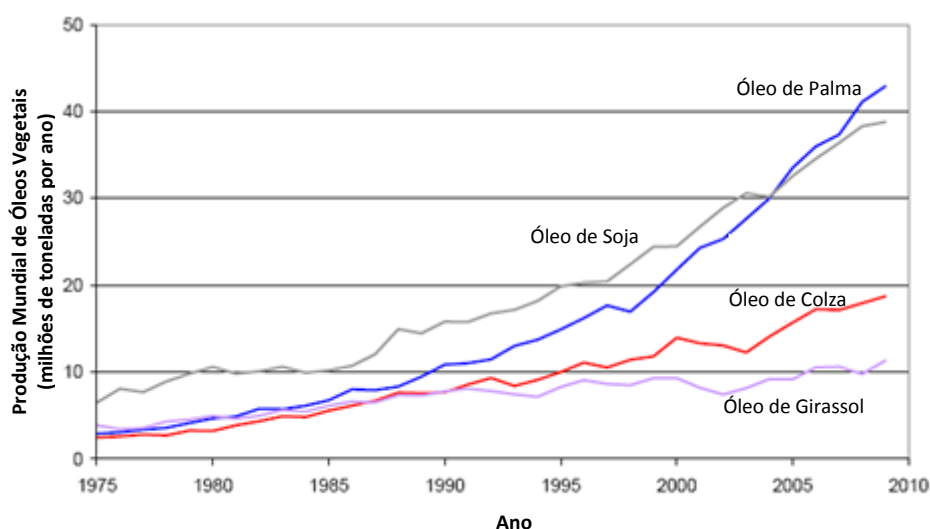


Figura 3: Evolução da produção mundial dos principais óleos vegetais, ao longo de 35 anos.
Fonte: Rosillo-Calle *et al*, 2009.

II.4. O girassol

II.4.1. A cultura do girassol

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma planta anual, da família das *Asteraceae*, originária da América do Norte. As flores desta planta são caracterizadas por possuírem grandes inflorescências do tipo capítulo (flores inseridas num receptáculo discóide ou arredondado protegido por brácteas), que podem variar dos 7 aos 30,5 cm na diagonal, com disco floral escuro e lígulas radiais de cor amarela, nos casos mais comuns, mas que também podem ter cor vermelho mogno, laranja ou branco e um caule, que pode atingir até três metros de altura. Uma característica peculiar do girassol é o heliotropismo - movimento da planta em direcção ao sol - da qual deriva o seu nome comum. A flor do girassol contém no seu interior várias centenas de sementes, com um comprimento entre 0,8 e 1,7 centímetros e largura entre 0,4 e 0,9 centímetros, sendo que a cor das mesmas varia de acordo com a variedade de girassol, podendo ir do preto, ao branco, passando por preto com listas verticais brancas (Grompone, 2005; RaB *et al*, 2008).

Os girassóis tiveram a sua origem em 3000 a.C. nos povos indígenas da América do Norte que os cultivavam para alimentação, no entanto, apenas no século XVI as sementes desta planta foram levadas para a Europa (Grompone, 2005). Actualmente é cultivada em todo o mundo (Figura 4), sendo uma oleaginosa que apresenta características agronómicas muito importantes, como o rápido crescimento, elevada resistência à seca, às temperaturas baixas e ao calor, o que lhe confere grande adaptabilidade a diferentes condições climáticas. Em Portugal, devido à capacidade de adaptação da cultura do girassol ao clima seco e quente, a quase totalidade da produção nacional ocorre no Alentejo (Figura 5).

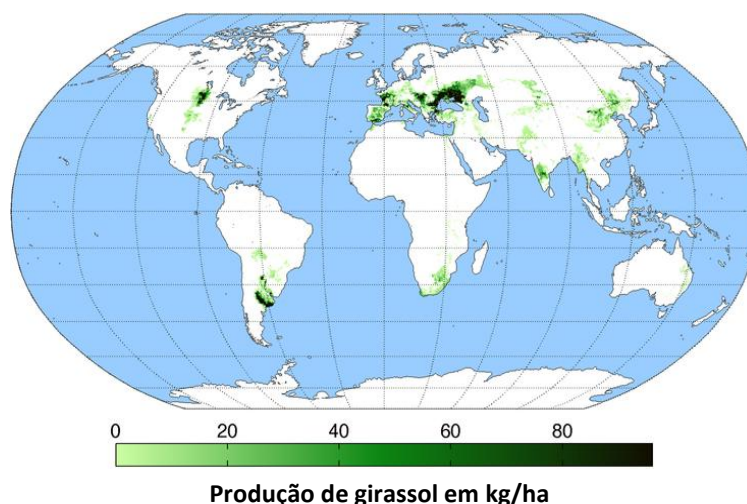


Figura 4: Produção mundial de girassol em kg/ha.
Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Sunflower>.

Esta grande versatilidade é ainda reforçada pelas várias aplicações relativas ao girassol, das quais se podem destacar:

- dos frutos, mais comumente chamados de sementes, é extraído o óleo de girassol, utilizado na alimentação humana - para cozinhar, em cru ou em margarinas - na área dos cosméticos e na produção de biodiesel;
- também as sementes desta planta podem ser utilizadas na alimentação humana;
- das flores do girassol pode ser produzido mel;
- em substituição de outros grãos, a semente de girassol é muitas vezes utilizada na alimentação animal, assim como as suas folhas;
- a flor é comercializada como ornamento, sendo algumas variedades especialmente produzidas para este fim;
- o girassol pode ser usado em adubação verde, devido ao seu desenvolvimento inicial rápido, à eficiência desta planta na reciclagem de nutrientes e como agente protector dos solos contra a erosão e infestação de invasoras, através do fenómeno da alelopatia - capacidade que as plantas possuem de produzirem substâncias químicas que, libertadas no ambiente de outras, influenciam de forma favorável ou desfavorável o seu desenvolvimento;
- os caules desta planta possuem uma fibra que pode ser utilizada na produção de papel.

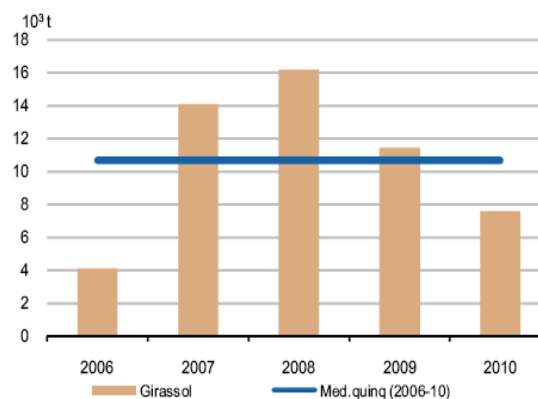


Figura 5: Produção nacional de girassol.

Fonte: INE, 2011.

II.4.2. Óleo de girassol

A grande importância económica do cultivo de girassol a nível mundial deve-se à excelente qualidade do óleo comestível que se extrai da semente desta planta, que é considerado dentro dos óleos vegetais, um dos que possui melhor qualidade a nível nutricional e organoléptico (aroma e sabor). Além disso, a massa resultante da extracção do óleo - altamente proteica - pode ser utilizada para produção de alimentação animal (Grompone, 2005).

Os maiores produtores de óleo de girassol a nível mundial são a Ucrânia, Rússia, Europa e Argentina, no entanto, os maiores consumidores são a Europa, a Rússia e a Turquia (Carvalho, 2010). A importância de um óleo em termos de consumo reflecte, em parte, a

distribuição geográfica da produção de sementes ou frutos associados a esse óleo, bem como dos usos e costumes do povo em questão. Assim, se justifica a elevada produção de óleo de girassol em regiões de grande abundância de sementes, onde o seu consumo é muito reduzido e países com baixa produção de óleo face às necessidades de consumo.

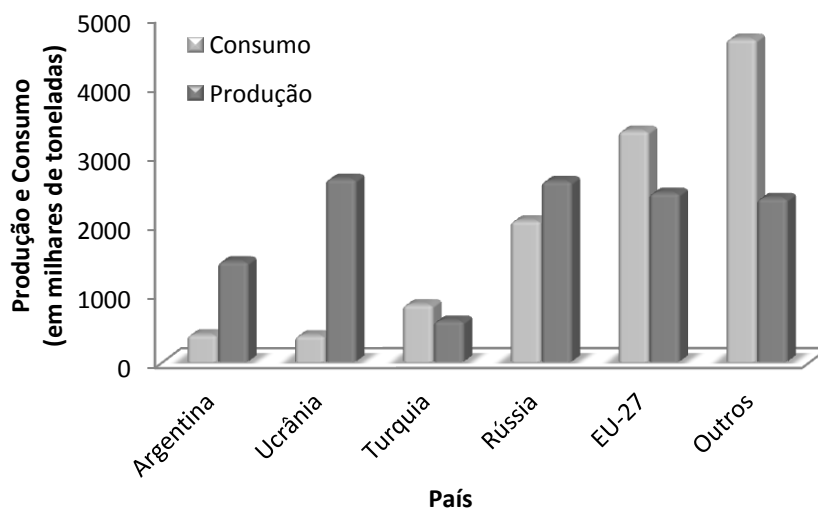


Figura 6: Principais países de produção e consumo de óleo de girassol.
Adaptado de Carvalho, 2010.

O óleo de girassol é essencialmente constituído por triacilgliceróis (98 - 99 %) e uma pequena fracção de fosfolípidos, tocoferóis, esteróis e ceras (fracção insaponificável). Possui um elevado teor em ácidos gordos insaturados (cerca de 83 %), mas um teor reduzido em ácido linolénico ($\leq 0,2$ %), sendo rico essencialmente em ácido linoleico, um dos ácidos gordos essenciais. As variações no teor deste ácido gordo são consequência não só da variedade, como de diferenças climáticas durante o seu cultivo. Dois factores que favorecem este óleo em termos de qualidade nutricional são o facto de proporcionar um ácido gordo essencial (ácido linoleico) e possuir, simultaneamente, baixa quantidade de ácido palmítico – que se pensa aumentar o colesterol LDL no sangue (Grompone, 2005). Para além disto, o ácido linoleico presente no óleo de girassol, pertencente ao grupo dos ácidos gordos ómega 6, é transformado pelo organismo humano em ácido araquidónico e em outros ácidos gordos polinsaturados. Os ómega 6 derivados do ácido linoleico exercem um importante papel fisiológico ao participarem na estrutura das membranas celulares, influenciando a viscosidade sanguínea, permeabilidade dos vasos, acção anti-agregadora, pressão arterial, reacção inflamatória e funções plaquetárias (Moraes & Colla, 2006).

Este óleo possui como constituinte maioritário da sua fracção tocoferólica a forma α -tocoferol, ao contrário da maioria dos óleos vegetais que têm a forma γ -tocoferol. O α -tocoferol presente no óleo de girassol apresenta, a temperaturas elevadas, menor actividade antioxidante do que o γ -tocoferol dos óleos em que é mais abundante, mas, por outro lado, o óleo de girassol apresenta maior actividade em vitamina E do que os óleos onde predomina a forma γ -tocoferol (Grompone, 2005).

Quadro III: Composição nutricional média do óleo de girassol (valores por 100 g).

Valores nutricionais por 100 g		
Energia		884 kcal
Hidratos de carbono		0 g
Gordura		100 g
	Saturada	10,3 g
	Monoinsaturada	19,5 g
	Polinsaturada	65,7 g
Proteína		0 g
Vitamina E		41,08 mg
Vitamina K		5,4 μ g

Adaptado de Grosvenor & Smolin, 2002; Karleskind, 1996.

Para além do óleo de girassol rico em ácido linoleico, existem hoje disponíveis no mercado outros tipos de óleo de girassol (Karleskind, 1996):

- óleo de girassol com alto teor de ácido linoleico (óleo de girassol tradicional);
- óleo de girassol com elevado teor de ácido oleico (aproximadamente 82 % de ácido oleico);
- óleo de girassol com teor médio de ácido oleico (aproximadamente 69 % de ácido linoleico).

As variações nos perfis de ácidos gordos são fortemente influenciadas tanto por factores genéticos da cultura, como pelo clima, sendo que se justifica o aparecimento deste tipo de óleos de girassol modificados de forma a aumentar a estabilidade oxidativa do mesmo - diminuindo o conteúdo em ácidos gordos polinsaturados e aumentando os monoinsaturados - mantendo o baixo nível de gordura saturada (Quadro IV) e a riqueza em vitamina E.

Quadro IV: Comparação da composição em ácidos gordos de óleo de girassol tradicional e óleo de girassol com elevado teor em ácido oleico.

Ácido gordo	Composição (%)	
	Óleo de girassol tradicional	Óleo de girassol com elevado teor em ácido oleico
Ácido Palmítico (C16:0)	7	3
Ácido Esteárico (C18:0)	4	5
Ácido Linoleico (C18:2)	70	9
Ácido Oleico (C18:1)	16	83
Ácido Linolénico (C18:3)	Pequenas quantidades	Pequenas quantidades

Adaptado de Karleskind, 1996.

O óleo de girassol é, assim, uma fonte importante de ácidos gordos essenciais e de vitamina E, que pode ser utilizado a frio directamente sobre os alimentos, em molhos para saladas, maionese, entre outros. Entra ainda na composição de numerosas margarinas e cremes vegetais de barrar, em combinação com outros componentes de ponto de fusão mais elevado e na produção de produtos de panificação e de conservas, tendo em conta que o seu teor de gordura saturada é mais baixo do que o de óleos de milho ou soja, por exemplo. Também pode ser utilizado como óleo de fritura, em especial as variedades ricas em ácido oleico, cuja estabilidade às alterações pelo aquecimento é superior à das variedades com teores elevados de ácido linoleico.

II.5. A soja

II.5.1. A cultura da soja

A soja (*Glycine max*), originária do leste Asiático, pertencente à família *Fabaceae*, é uma leguminosa rica em proteína, que é cultivada para alimentação humana e animal e ainda para a produção de biodiesel. Esta leguminosa foi durante muito tempo um alimento desconhecido, excepto para segmentos muito específicos da população - por exemplo, os vegetarianos - no entanto, hoje é amplamente usada na alimentação humana, quer na forma de bebida (mais conhecida como leite de soja), quer na forma de tofu ou como ingrediente de sumos de fruta e iogurtes.

A soja é uma planta anual, cultivada nos meses mais quentes - com temperaturas entre os 20 e 40 °C - sendo uma cultivar muito rentável, visto que é uma planta muito resistente a

parasitas. A altura desta leguminosa pode variar entre os 20 centímetros e os 2 metros; as vagens, caules e folhas estão cobertos de pequenos pêlos castanhos ou cinzentos e as folhas são trifoliadas, com três a quatro folhetos por cada folha. As flores férteis nascem na axila da folha e podem possuir cor branca, rosa ou roxa, sendo que, antes das sementes atingirem a maturidade, caem as folhas. O fruto, que cresce em aglomerados de três ou quatro, é uma vagem peluda de 3 a 8 centímetros e contém cerca de duas a quatro sementes no seu interior. A semente da soja possui um invólucro duro, resistente à água e com função de protecção da mesma, podendo este possuir várias cores, incluindo preto, castanho, azul, amarelo e verde. A semente é constituída por aproximadamente 40 % de proteína, 21 % de óleo, 34 % de hidratos de carbono e 5 % de cinzas (Wolf & Cowan, 1975).

A cultura da soja teve a sua origem no leste Asiático, onde possuiu um importante papel como parte da dieta das populações durante séculos. No início do século XVIII esta cultura foi introduzida na Europa e em 1765 nas colónias britânicas da América do Norte, onde foi inicialmente cultivada para forragem. No entanto, apenas em 1910 a cultura da soja ganhou a devida importância alimentar fora do continente Asiático, sendo que na América foi considerada apenas um produto industrial, até 1920, altura em que começou a ser considerada mais importante a nível alimentar (Wolf & Cowan, 1975). Actualmente os maiores produtores de soja a nível mundial são os Estados Unidos da América, Brasil e Argentina (Figura 7), tendo, entre 1970 e 2007, os dois últimos vindo a aumentar a produção desta leguminosa, relativamente aos Estados Unidos da América. A produção mundial desta semente em 2009/2010 foi de aproximadamente 260 milhões de toneladas (*The AOCS Lipid Library*, 2011).

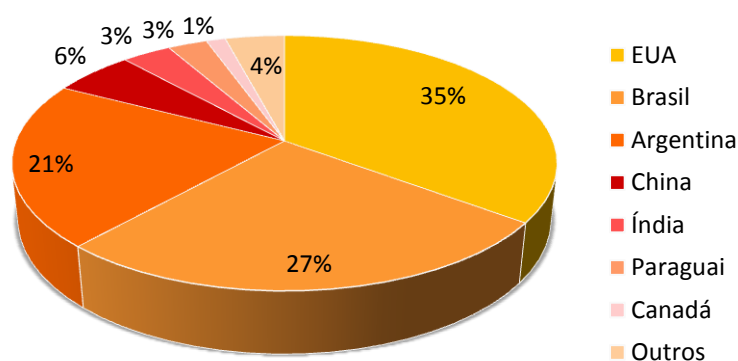


Figura 7: Principais países produtores de soja (dados de 2009/2010).
Adaptado de *The AOCS Lipid Library*, 2011.

A soja é considerada uma fonte completa de proteína, pois contem quantidades significativas de todos os aminoácidos essenciais, que têm necessariamente de ser fornecidos ao organismo humano, visto que este não possui capacidade de os sintetizar. Para além disto, esta leguminosa e os seus derivados, ricos em isoflavonas, desempenham um papel importante na atenuação ou tratamento dos sintomas associados à menopausa (calores, afrontamentos, dores articulares, aumento de peso, etc.). O seu elevado teor de fibra é de extrema importância para o trânsito intestinal e para evitar picos de glucose no sangue, visto que retarda a absorção de açúcares, sendo extremamente benéfico para diabéticos. Para indivíduos com estômago sensível, a soja pode não ser tolerada, devendo-se, neste caso, optar pelos derivados fermentados, sendo que a fermentação leva a um aumento do teor de vitamina B12, que é quase exclusiva de alimentos animais, pelo que, este tipo de alimento é essencial para uma dieta vegetariana (Silva, 2001; Wolf & Cowan, 1975).

II.5.2. Óleo de soja

As sementes da soja podem ser processadas de variadas maneiras, originando refeições de soja, farinha, leite de soja, tofu, proteína vegetal texturizada usada na preparação de vários alimentos vegetarianos, lecitina de soja e óleo de soja. No entanto, a maioria da cultura desta leguminosa destina-se à produção do correspondente óleo vegetal, resultando da extracção do mesmo uma pasta com elevado teor proteico, que é utilizada para alimentação animal. Apenas uma pequena quantidade do cultivo da soja é destinado ao consumo humano directo (Silva, 2001).

A produção de óleo de soja é altamente dependente do mercado existente para o respectivo bagaço e/ou produtos à base de grão integral, comparativamente com os outros óleos vegetais. A importância da proteína de soja tem conduzido a elevadas produções de óleo de soja, apesar deste ter um elevado nível de ácidos gordos polinsaturados, que o tornam susceptível à oxidação e consequentemente promove o desenvolvimento de odores e sabores estranhos, bem como um elevado conteúdo em fosfatídeos, que necessitam de ser removidos, mas que constituem uma importante fonte comercial de lecitina. Uma possibilidade em questão para a resolução deste obstáculo passa pelo melhoramento genético da cultura da soja, com a finalidade de obter sojas do tipo oleico, que representam uma gordura mais estável em termos de oxidação (Silva, 2001).

Os maiores produtores e consumidores de óleo de soja, a nível mundial, são os Estados Unidos da América, China, Brasil e Argentina, sendo que a Europa consome pouco mais do que aquilo que produz (Figura 8). Segundo dados de 2009/2010, tanto a produção como o consumo mundial deste óleo aproxima-se das 38 milhões de toneladas (*The AOCS Lipid Library*, 2011).

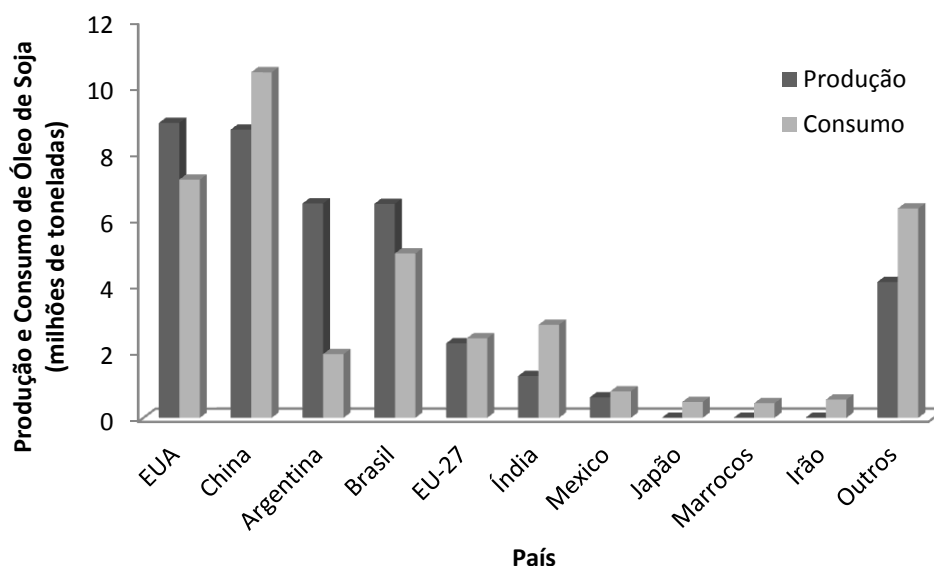


Figura 8: Principais produtores e consumidores de óleo de soja (dados de 2009/2010). Adaptado de *The AOCS Lipid Library*, 2011.

A semente da soja possui aproximadamente 20 % de óleo, que é um dos mais consumidos a nível mundial, exceptuando apenas o óleo de palma (Carvalho, 2010). O óleo de soja bruto é constituído tipicamente por 96 % de triglicéridos, 2 % de fosfolípidos, 1,6 % de matéria insaponificável (maioritariamente esteróis e tocoferóis), 0,5 % de ácidos gordos livres, bem como, pequenas quantidades de pigmentos carotenóides, sendo que, após refinação do óleo, a fracção não triglicerídica fica reduzida a menos de 1 % (Silva, 2001). A composição em ácidos gordos do óleo de soja depende da variedade e das condições de cultura, mas uma composição típica será de 10 - 18 g de gordura saturada, 17 - 26 g de monoinsaturada e 54 - 72 g de polinsaturada, por cada 100 g de óleo de soja. Os ácidos gordos insaturados maioritários no óleo de soja (Quadro VI) compreendem 4 a 10% de ácido α -linolénico (C18:3), 50 a 62 % de ácido linoleico (C18:2) e 17 a 26 % de ácido oleico (C18:1). Contém ainda ácidos gordos saturados – aproximadamente 2 a 5 % de ácido esteárico (C18:0) e 8 a 13 % de ácido palmítico (C16:0) – que são ácidos gordos saturados de cadeia longa (Karleskind, 1996).

Quadro V: Composição nutricional média do óleo de soja (valores por 100 g).

Valores nutricionais por 100 g		
Energia		886 kcal
Hidratos de carbono		0 g
Gordura		98,5 g
	Saturada	15,5 g
	Monoinsaturada	22,1 g
	Polinsaturada	55,6 g
Proteína		0 g
Vitamina E		16 mg

Adaptado de Grosvenor & Smolin, 2002; Karleskind, 1996.

O óleo de soja possui aplicações alimentícias diversificadas tais como óleo de cozinha, tempero de saladas, produção de margarinas, gordura vegetal, maionese, entre outras. Uma vantagem do óleo de soja relativamente aos outros óleos vegetais é o seu baixo preço aliado à excelente qualidade. Para além disto, os bagaços resultantes da extracção do óleo de soja são ricos em proteína e por isso são procurados como suplemento proteico, não só para rações animais, mas também como suplemento proteico vegetal na alimentação humana, que é, a nível mundial, muito pobre em proteínas de origem vegetal (Silva, 2001).

Quadro VI: Composição típica em ácidos gordos do óleo de soja.

Ácido gordo	Composição (%)
Ácido Palmítico (C16:0)	8 – 13
Ácido Esteárico (C18:0)	2 – 5
Ácido Linoleico (C18:2)	50 – 62
Ácido Oleico (C18:1)	17 – 26
Ácido Linolénico (C18:3)	4 - 10

Adaptado de Karleskind, 1996.

O facto do óleo de soja ser rico em gorduras polinsaturadas, torna-o importante como fonte de ácidos gordos essenciais – ácido linoleico e linolénico – que possuem como função a protecção das artérias da deposição do colesterol, facilitam ainda o processo digestivo e promovem a absorção de vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) (Guiné & Henriques, 2011).

II.6. Modo de produção de um óleo vegetal

Os óleos vegetais podem ter origem na polpa dos frutos ou em sementes oleaginosas, sendo que, os métodos de extracção de um óleo variam consoante a matéria-prima de partida, tendo em conta que as sementes podem ser armazenadas, enquanto a polpa de frutos necessita de ser imediatamente processada, para evitar decomposição lipídica, que se inicia imediatamente após a colheita.

No entanto, a maioria dos óleos vegetais é obtido a partir de sementes oleaginosas por processos de extracção, que originam um óleo bruto, o qual sofre posteriormente refinação. Este processo pode dividir-se em três blocos com várias etapas (Freire, 2002):

- Pré-tratamentos: selecção e limpeza das sementes, secagem, descasque, trituração e cozedura;
- Obtenção do óleo: extracção, eliminação de solventes;
- Refinação: desgomagem, neutralização, branqueamento e desodorização.

Relativamente à etapa de pré-tratamento há a salientar que antes de se proceder à extracção do óleo é necessário averiguar a qualidade das sementes e a rentabilidade do processo. Os aspectos da colheita, armazenamento e manuseamento de oleaginosas são factores importantes a ponderar na avaliação do seu valor comercial. Material estranho, tal como folhas verdes, sementes imaturas, insectos, pigmentos, humidade e temperatura podem provocar oxidação e deterioração da matéria-prima.

Após a colheita, as sementes oleaginosas são sujeitas a um processo de secagem, o que permitirá um armazenamento prolongado, com o mínimo de deterioração. Procede-se em seguida à remoção de impurezas recorrendo para tal a aspiradores, peneiras e imãs. Este é um passo de extrema importância para a obtenção de um óleo de elevada qualidade e também para prevenir que ocorram danos nos equipamentos. Após a eliminação de impurezas, muitas sementes necessitam de ser descascadas, de que é exemplo, as sementes de girassol, sendo que, este passo serve para aumentar a capacidade de extracção. Em seguida procede-se à cozedura, um passo importante na inactivação de enzimas lipolíticas ou outras indesejáveis e para promover o rompimento da estrutura da célula (Freire, 2002).

O passo seguinte – após o pré-tratamento das sementes – é a obtenção propriamente dita do óleo, sendo que, a extracção, na maioria dos casos, se realiza mediante pressão,

seguida de extracção com um solvente orgânico. Nesta segunda extracção tritura-se o resíduo, seca-se e submete-se a uma extracção por percolação, habitualmente em contracorrente. A mistura solvente/óleo separa-se por destilação com recuperação de solvente. Um dos solventes permitidos e dos mais usados é o hexano, que, apesar de ser inflamável, é menos tóxico do que os outros possíveis solventes. O bagaço resultante do processo de remoção de solvente é destinado à alimentação animal (Freire, 2002).

O produto obtido por pressão e extracção das sementes oleaginosas é um óleo bruto, que contém 10 a 15 % de impurezas, principalmente ácidos gordos livres e fosfolípidos, que são posteriormente eliminados através de um processo de refinação. É necessária a eliminação destes compostos, pois podem conferir sabor, cheiro e aparência desagradáveis e diminuir a estabilidade do produto final. A refinação engloba quatro processos (Freire, 2002):

- a) Desgomagem: é uma etapa que visa remover fosfatídios que, devido ao seu poder emulsionante, conduziriam a perdas de óleo durante o processo de refinação. Na desgomagem procede-se à hidratação dos fosfatídios usando soluções aquosas de ácido fosfórico ou cítrico a 60 – 80 °C. Os fosfatídios tornam-se insolúveis no óleo, sendo removidos por centrifugação ou filtração.
- b) Neutralização: é a segunda etapa do processo de refinação, sendo necessária pelo facto de os óleos brutos possuírem teores elevados de ácidos gordos livres, que é um risco acrescido de deterioração oxidativa do óleo em questão. Uma colheita cuidada e um armazenamento adequado das sementes são muito importantes para a obtenção de um óleo bruto com um teor em ácidos gordos livres reduzido. Estes compostos provocam odores desagradáveis, irritação na língua e garganta, pelo que, têm de ser removidos para que o óleo se torne edível. Para a remoção dos ácidos gordos livres, os óleos são tratados com hidróxido de sódio (NaOH) ou potássio (KOH) a quente. Os ácidos gordos precipitam na forma de sabão e podem ser eliminados por adição de água e decantação/centrifugação. Na solução alcalina também podem ser eliminadas outras impurezas como proteínas, fosfolípidos e sais minerais.
- c) Branqueamento: o seu principal objectivo é a remoção dos compostos corados indesejáveis presentes nos óleos brutos ou parcialmente refinados. O método baseia-se na oxidação/absorção de pigmentos, recorrendo-se para tal a terras ou carbono activados, o que origina um produto sem cor. Nesta fase podem ainda ser eliminados peróxidos, iões de metais pesados, aflotoxinas e alguns pesticidas.
- d) Desodorização: normalmente é o último passo na refinação de óleos. Consiste basicamente em eliminar algumas substâncias, não eliminadas nas fases anteriores e/ou resultantes de degradações ocorridas ao longo do processo de refinação, que produzem

odores desagradáveis, como aldeídos, cetonas ou resíduos de ácidos gordos livres. Recorre-se para tal a destilação a pressão reduzida e temperaturas próximas de 200 °C, devendo evitar-se aquecimentos prolongados que podem originar polimerização. A remoção destas substâncias assegura a estabilidade do produto, garantindo-lhe um período de vida aceitável.

Em geral não se quantificam com rigor as características do óleo após cada etapa de refinação, no entanto, é imprescindível um controlo eficaz de todas as operações unitárias, de modo a satisfazer as especificações impostas por lei, para cada tipo de óleo. As características finais do óleo refinado são avaliadas com base em análises físico-químicas e organolépticas, recorrendo-se, para tal a um painel de provadores.

A extracção recorrendo a hexano continua a ser uma questão problemática no desenvolvimento da indústria dos óleos. O hexano usado comercialmente não é *n*-hexano puro, mas uma fracção do petróleo, que consiste numa mistura de hidrocarbonetos saturados com seis átomos de carbono, da qual o *n*-hexano pode estar na percentagem de 50 a 90 % em volume (iso-hexano e metilciclopentano costumam estar presentes em quantidades apreciáveis). No controlo de qualidade do solvente deve ter-se em atenção que o ponto de ebulição não pode ser inferior a 65 °C, não deve conter enxofre (produz odores indesejáveis e cria problemas na refinação e hidrogenação) e os teores em benzeno e outros compostos aromáticos devem ser baixos, dada a sua toxicidade. As principais desvantagens do hexano relacionam-se com a alta inflamabilidade e dependência do petróleo como matéria-prima (Freire, 2002).

Para o objectivo deste trabalho – a implementação de um método para a determinação de contaminação por óleo mineral, em óleo de girassol – é importante saber o modo de produção de um óleo, visto que, é nesta etapa que, mais provavelmente, o óleo de girassol pode ser contaminado através do contacto com hexano impuro.

II.7. Óleo mineral

O óleo mineral, também chamado de parafina líquida, vaselina líquida ou óleo branco, é um produto secundário derivado da destilação do petróleo no processo de produção de gasolina, sendo, consequentemente, produzido em grandes quantidades e logo, um produto de baixo custo. Caracteriza-se por ser um óleo transparente, incolor e quimicamente quase

inerte, composto essencialmente por alcanos - tipicamente entre 15 e 40 carbonos - e parafinas cíclicas (Karasek *et al*, 2010).

II.7.1. Aplicações do óleo mineral

As possibilidades de utilização deste óleo são diversas:

- como óleo de refrigeração e isolamento de transformadores eléctricos;
- para transporte e armazenamento de metais alcalinos (evitando a reacção destes com a humidade atmosférica);
- na área medicinal, como laxante;
- como hidratante em cremes e loções;
- como auxiliar tecnológico (por exemplo, como lubrificante);
- na forma de emulsão (numa mistura de água, sabão e óleo mineral) no combate a pulgões e colchonilhas em plantas, ou seja, como produto fitossanitário, sendo este classificado ao nível ecotoxicológico como isento, ou seja, não apresenta problemas ao nível ambiental e para a saúde humana, podendo mesmo ser usado em agricultura biológica;
- como aditivo alimentar (por exemplo, como agente de revestimento).

Devido a esta diversidade de aplicações, este óleo é produzido em dois graus de pureza: em grau técnico e em grau medicinal ou grau alimentar, sendo este último uma fracção do óleo mineral ao qual foram extraídos, com recurso a solventes, os hidrocarbonetos aromáticos e subsequentemente sujeito a hidrogenação para converter o resíduo de hidrocarbonetos aromáticos em hidrocarbonetos saturados.

II.7.2. Óleo mineral em alimentos

A presença de hidrocarbonetos de origem mineral em vários alimentos é conhecida desde o início de 1990. São exemplos disso, as nozes, grãos de café, arroz e outros alimentos que são vulgarmente transportados e armazenados em embalagens de sisal e juta, que possuem frequentemente contaminação por óleo mineral, libertado das fibras lubrificadas. Este lubrificante das fibras não é de grau alimentar, pelo que, possui elevadas quantidades de hidrocarbonetos aromáticos e poliaromáticos. Outro exemplo, compreende salame, bombons, mel e outros produtos que entram em contacto com materiais de embalagem

contendo óleo mineral, como é o caso de papel encerado, caixas revestidas com papel encerado ou latas revestidas de parafina. Também o pão, biscoitos e outros produtos de padaria podem aparecer contaminados com hidrocarbonetos de origem mineral provenientes da utilização de óleo mineral como agente antiaderente, ou seja, para facilitar o desenformar dos produtos de padaria (Fiorini *et al*, 2008; Karasek *et al*, 2010; Moret *et al*, 1997). Alimentos secos para bebés e cereais podem apresentar este tipo de contaminação resultante da migração dos componentes mais voláteis, da mistura que se designa óleo mineral, do papel reciclado de que é feita a cartonagem ou das impressões feitas na mesma - uma vez que, as tintas usadas para ilustrar as cartonagens que embalam os alimentos são uma mistura de componentes que compreendem, entre outros, produtos derivados do óleo mineral de elevado ponto de ebulição (Droz & Grob, 1997; Vollmer *et al*, 2011). Os vegetais também podem apresentar este tipo de contaminação proveniente de poluição ambiental ou de resíduos de formulações de pesticidas (Fiorini *et al*, 2008).

No entanto, a contaminação com hidrocarbonetos de origem mineral nunca havia sido considerada perigosa para a saúde até ao incidente, em 2008, das 100 000 toneladas de óleo de girassol proveniente da Ucrânia contaminado com elevadas concentrações de óleo mineral, tendo em conta que dentre as várias toneladas contaminadas, existia óleo de girassol bruto contaminado com até 7000 mg/kg e óleo de girassol refinado com 2000 mg/kg. A proveniência desta contaminação elevadíssima nunca chegou a ser confirmada, mas as autoridades suspeitam de fraude, com a adição intencional de óleo mineral ao óleo de girassol (Biedermann & Grob, 2009).

A contaminação de óleo de girassol por óleo mineral pode ocorrer em três situações distintas, sendo, na maioria dos casos, difícil rastrear a origem de tal contaminação:

- Contaminação com resíduos de produtos fitossanitários, o que é uma situação rara, visto que, o pesticida que contém na sua formulação óleo mineral (chamado óleo de verão) é considerado isento em termos toxicológicos, pelo que, não persiste por períodos longos nos produtos onde é aplicado e, assim, considera-se que não é perigoso para a saúde;
- Contaminação durante a etapa de extracção do óleo, o que pode ocorrer por utilização de *n*-hexano (solvente de extracção) contaminado ou por fugas de óleo dos equipamentos ou ainda por contacto do óleo vegetal com óleo utilizado para efeitos de limpeza e manutenção desses mesmos equipamentos, sendo esta a justificação mais comum para o aparecimento deste tipo de contaminação;
- Deposição de óleo mineral nas sementes de girassol a partir do ar, ou seja, resultante de poluição, que pode ter um contributo extremamente elevado e importante para a

contaminação de produtos alimentícios com óleo mineral, resultante de gases expelidos do tubo de exaustão de motores a diesel, poeiras de estradas pavimentadas, gases libertados de motores a gasolina, fumos da operação de transformar industrialmente carnes e fumaça da queima de madeira - listados por ordem de importância (Neukom *et al*, 2002).

II.7.3. Toxicidade do óleo mineral

Os hidrocarbonetos de origem mineral podem entrar em contacto com o corpo humano, não só pela via alimentar, mas também através de cosméticos, produtos farmacêuticos e pelo ambiente.

A nível toxicológico, o óleo mineral de grau alimentar ou medicinal é geralmente seguro para o contacto e consumo por parte do ser humano e foi aprovado pela *Food and Drug Administration* - FDA o seu uso ao nível de cuidados pessoais e produtos cosméticos, assim como aditivo alimentar, possuindo uma dose de ingestão diária aceitável (ADI) de 10 mg/kg de peso vivo (Fiorini, 2010). Assim, o óleo mineral de grau alimentar – também conhecido como óleo mineral branco – não constitui um perigo toxicológico, podendo mesmo ser usado como aditivo alimentar (que é declarado no rótulo dos alimentos em que é utilizado como tal), no entanto, uma presença inesperada de óleo mineral num dado alimento deve ser sempre considerado um alerta, visto não existir informação acerca da proveniência e composição desse óleo mineral.

Ainda relativamente à investigação da toxicidade do óleo mineral, foi efectuado um estudo pela Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) para avaliação toxicológica do mesmo, sendo, para tal, os derivados do óleo mineral agrupados em classes (Grundböck *et al*, 2010):

- O óleo mineral é considerado de baixa toxicidade desde que seja altamente refinado ou um óleo branco (óleo de grau alimentar), ou seja, constituído exclusivamente por hidrocarbonetos saturados e com massa molecular suficientemente elevada para que a absorção por parte do organismo seja o mais baixa possível (massa relativa de pelo menos 480 Da e menos de 5 % de componentes abaixo dos C₂₅), possuindo neste caso, um nível diário de ingestão aceitável de 10 mg/kg de peso vivo;
- Óleos minerais com baixas massas moleculares e mais de 5 % de componentes abaixo dos C₂₅, possuem um ADI 1000 vezes mais baixo, ou seja 0,01 mg/kg de peso vivo.

Neste estudo (Grundböck *et al*, 2010) verificou-se que a maior parte das contaminações contabilizadas pertence à segunda classe considerada, logo, assumindo um peso de 60 kg e o consumo diário de 1 kg de alimentos contaminados com óleo mineral deste tipo, o limite legal será de 0,6 mg por kg de alimento. No entanto, estes cálculos não têm em conta que, segundo este mesmo estudo, a maior parte dos óleos minerais que contaminam os alimentos não são de grau alimentar e, portanto, contém compostos aromáticos. Assim, tendo em conta os dados dos estudos toxicológicos efectuados pela JECFA neste âmbito, verifica-se que nem um valor de 0,6 mg/kg para o limite de contaminação por óleo mineral não próprio para fins alimentares, pode não ser considerado seguro.

O que se verifica ao nível de estudos toxicológicos (Grundböck *et al*, 2010; EFSA, 2009) é que se tem negligenciado o facto de o óleo mineral ser extremamente importante em termos de toxicidade para o organismo humano, visto que é um dos contaminantes alimentares mais encontrados nos diversos alimentos, normalmente com origem desconhecida, e um dos maiores contaminantes no organismo humano, tendo uma pessoa em média 1 g de parafinas minerais acumulada na gordura, atingindo em casos extremos as 10 g (Concin *et al*, 2008; Fiorini *et al*, 2008; Grundböck *et al*, 2010).

Estimativas conservadoras indicam que o consumo diário de parafinas minerais, a nível Europeu, oscila entre 0,39 e 0,91 mg por kg de peso vivo, por dia, para um adulto e na ordem de 0,75 a 1,77 mg por kg de peso vivo, por dia, para uma criança (Tennant, 2004), sendo as fontes de tal exposição o mais variadas possível, dadas as aplicações do óleo mineral a nível alimentar. Estes valores correspondem a uma concentração média de óleo mineral nos alimentos de 25 a 60 mg/kg, tendo como referência o consumo de um quilograma de alimento por dia. O organismo humano tem ainda contacto com hidrocarbonetos minerais através de cosméticos e medicamentos, no entanto, para este tipo de produtos não existem estudos sobre exposição.

Tendo em conta a informação disponível em termos de estudos toxicológicos, efectuados com animais (EFSA, 2009; Nash *et al*, 1996) não existem evidências que sugiram que a exposição tóxica crónica ou sub-crónica a óleo mineral branco, ou seja, altamente refinado, produza mudanças significativas ou alterações histopatológicas ao nível dos órgãos internos ou nos locais de aplicação. Analogamente, não existe evidência de que exposição tóxica crónica a óleos minerais brancos produza qualquer efeito adverso ou diminua o tempo de vida dos animais onde tais estudos foram efectuados. A preocupação relativamente à exposição a óleos minerais está amplamente relacionada com os resultados obtidos num estudo com ratos, onde a ingestão durante noventa dias de óleo mineral produziu

granulomas ao nível do fígado e histiocitose nos linfonodos mesentéricos, sem qualquer toxicidade clínica evidente, sendo que se verificou posteriormente, por reprodução do estudo com outras espécies, que estes sintomas só acontecem especificamente nesta espécie. Para além disso, a importância das alterações histopatológicas, verificadas nessa espécie isoladamente, são questionáveis, dada a ausência de toxicidade clínica ou impacto mensurável no bem-estar ou esperança média de vida do animal (EFSA, 2009; Nash *et al*, 1996).

Em estudos de toxicidade a curto prazo do óleo mineral – toxicidade aguda (EFSA, 2009), foram efectuados testes em ratos utilizando uma grande diversidade de tipos de óleos minerais, desde óleos de baixa viscosidade, até elevada viscosidade. Verificou-se que os óleos de maior viscosidade não induziram qualquer efeito histopatológico; os óleos de média viscosidade não produziram efeitos adversos, apesar de existirem evidências da presença de hidrocarbonetos minerais no fígado; relativamente ao óleo de mais baixa viscosidade verificaram-se efeitos ao nível do fígado e dos nodos linfáticos, consistindo as alterações num aumento do peso dos órgãos, presença de hidrocarbonetos minerais no fígado e alterações granulométricas no mesmo, assim como aparecimento de histiocitose. Assim, o grau de toxicidade aguda do óleo mineral está inversamente relacionado com viscosidade do mesmo. Estes estudos permitiram calcular um NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) de 2000 mg/kg de peso vivo/dia para óleos de alta e média viscosidade.

Algumas considerações farmacodinâmicas importantes após exposição oral ou tópica a óleo mineral possuem impacto na deposição e potencial de alterações patológicas atribuídas a essa administração de óleo. É razoável assumir que, após administração oral, os hidrocarbonetos minerais absorvidos pelo tracto gastrointestinal são transportados para o fígado pela circulação normal, sendo assim o fígado exposto a concentrações relativamente elevadas de hidrocarbonetos minerais, podendo resultar em alguma acumulação, como uma resposta fisiológica natural. Similarmente, os linfonodos mesentéricos estarão expostos inicialmente a quantidades relativamente elevadas de hidrocarbonetos minerais após uma dose de ingestão oral, comparativamente com outros tecidos mais distantes. Também, dada a absorção limitada de óleos minerais por parte da pele, torna-se pouco provável, mesmo que sob condições extremas, que uma quantidade significativa de material esteja disponível para distribuição por outros tecidos, como por exemplo, os linfonodos mesentéricos.

Ao nível do óleo de girassol ficou estabelecido, pelo *Standing Committee on The Food Chain and Animal Health* e pela Comissão Europeia, em 2008, aquando do episódio de óleo de girassol Ucrainiano contaminado, um limite máximo de 50 mg/kg de óleo de mineral, tanto

em óleo de girassol bruto, como em óleo de girassol refinado (Fiselier & Grob, 2009; Karasek *et al*, 2010).

II.8. Cromatografia gasosa

Para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados com origem em óleo mineral, o método especificado neste trabalho, assim como a norma ISO relativa a esta determinação, utilizam cromatografia gasosa em coluna capilar com injeção *on column* e detector *FID*.

A cromatografia é a designação dada a uma técnica de separação, que permite separar e detectar analitos específicos em misturas complexas e diversificadas. Esta técnica baseia-se na interacção diferenciada dos analitos a separar entre uma fase móvel e uma fase estacionária, podendo definir-se diferentes tipos de cromatografia consoante o tipo destas duas fases. Quando a fase móvel é um gás, esta chama-se cromatografia gasosa, podendo ainda ser classificada de cromatografia gás-sólido, quando a fase estacionária é um sólido e cromatografia gás-líquido quando a fase estacionária é um líquido.

Na cromatografia gás-líquido a separação tem lugar numa coluna empacotada com um material poroso, inerte sobre o qual o líquido, constituindo a fase estacionária se encontra depositado sob a forma de um fino filme líquido. A amostra injectada no bloco de injeção aquecido onde se evapora – ou mais especificamente, neste caso, directamente na coluna cromatográfica (injeção *on column*) – é arrastada ao longo da coluna pelo gás, que constitui a fase móvel. Durante este período, as moléculas dos componentes, passam parte do tempo na fase estacionária e outra parte na fase móvel, sendo assim, arrastadas através do percurso cromatográfico. O atraso relativo sofrido no percurso por cada componente, leva a que surjam no final da coluna, a tempos diferentes. O tempo total de retenção vai ser a soma do tempo que as moléculas passam exclusivamente na fase móvel, com o tempo de interacção com a fase estacionária (Dias, 2009).

A estrutura típica de um cromatógrafo gasoso encontra-se esquematizada na Figura 9.

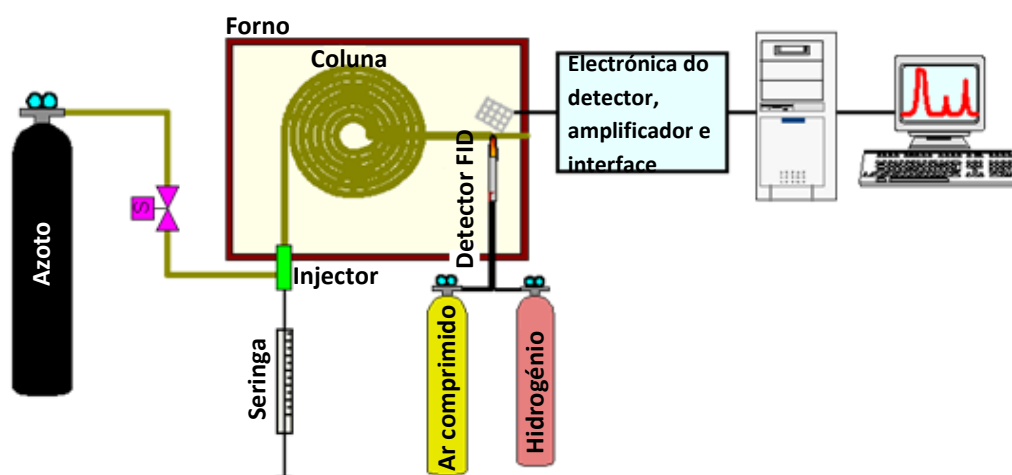


Figura 9: Esquematização da estrutura de um cromatógrafo gasoso.
Adaptado de Kvasnicová & Balinová, 2006.

Os componentes de um cromatógrafo gasoso (Dias, 2009; Skoog *et al*, 1998) compreendem:

- **Reservatório de Gás**

O gás de arraste deve ser inerte de modo que não interaja nem com a amostra, nem com a fase estacionária. Os gases mais comumente usados são hélio, azoto e hidrogénio, tendo este último o inconveniente de ser explosivo. Os caudais são regulados através de válvulas redutoras de alta pressão.

- **Injector**

As amostras a analisar podem ser gasosas, líquidas ou sólidas, sendo o método de injeção diferente para cada caso. Neste trabalho especificamente as amostras a analisar encontrar-se-ão no estado líquido e a injeção é efectuada *on column*. Numa injeção *on column* os compostos a analisar são introduzidos directamente dentro da coluna. A injeção é efectuada a frio e a seringa, apropriada para o efeito, entra dentro da coluna. Este modo de injeção é utilizado para compostos de peso molecular elevado, termicamente instáveis.

- **Coluna**

A coluna é chamada o coração do cromatógrafo, visto que é aqui que se dá a separação dos compostos de interesse. As colunas podem ser classificadas em colunas de enchimento e colunas capilares, tendo no entanto, as primeiras, entrado em desuso. As colunas capilares são tubos capilares normalmente com diâmetros internos de 0,05 a 0,50 mm e

com comprimentos que podem ir de 10 a 100 metros, revestidas interiormente por uma camada muito fina de fase líquida. Estas colunas são mais eficientes que as colunas empacotadas, obtendo-se melhores separações a baixa temperatura e para menores intervalos de tempo.

- **Detector**

Existem vários tipos de detectores, como detectores de ionização por chama (*FID*), de condutividade térmica, captura electrónica ou fotómetro de chama, no entanto, porque este método usa um detector *FID*, será o detector de ionização por chama o abordado nesta análise.

O design de um detector varia de fabricante para fabricante, no entanto, os princípios em que se baseia a construção de um detector deste tipo são sempre os mesmos (Figura 10). O eluente que sai da coluna cromatográfica entra no forno do detector, sendo este forno necessário para assegurar que logo que o eluente deixa a coluna não abandona a fase gasosa, o que levaria à deposição do mesmo na interface entre a coluna e o detector, resultando em perda de eluente e erros ao nível da detecção. À medida que o eluente viaja ao longo do detector, é primeiramente misturado com hidrogénio e depois com o oxidante. A mistura eluente/combustível/oxidante continua a viajar ao longo do detector até à fonte da chama onde existe uma tensão positiva, que serve para afastar os iões de carbono reduzidos, criados na chama num processo de pirólise. Os iões criados são então repelidos em direcção aos pratos colectores, que estão conectados a um amperómetro extremamente sensível que vai detectar o choque dos iões com esses pratos, passando esse sinal depois para o amplificador, em seguida para o integrador e depois ainda para o sistema de exibição de resultados. Os produtos da chama são no final do processo expelidos para fora do detector pela porta de escape (Skoog *et al*, 1998).

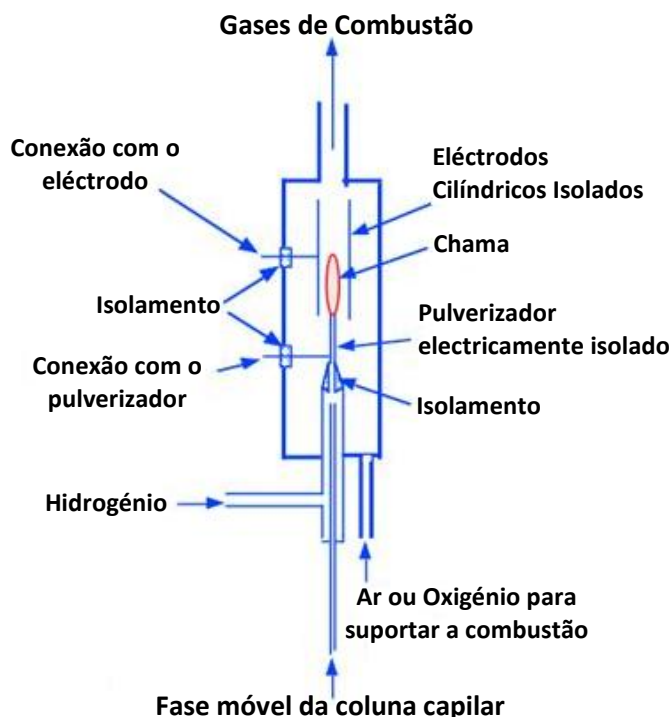


Figura 10: Esquematisação da estrutura de um detector de ionização por chama.

Adaptado de <http://www.chromatography-online.org/Chrial-GC/The-Flame-Ionization-Detector-FID.html>.

Assim, o funcionamento de um sistema de cromatografia gasosa com injeção *on column* e detector *FID* pode resumir-se da seguinte forma: as amostras são introduzidas no início da coluna cromatográfica por intermédio de uma seringa apropriada para injeção directa na coluna. A amostra é arrastada pela fase móvel (gás de arraste) ao longo da coluna cromatográfica. Pela aplicação de um programa de rampas de temperaturas, os diferentes compostos da mistura são separados. Estes compostos saem da coluna dissolvidos no gás de arraste e passam pelo detector *FID*, onde irão sofrer pirólise à temperatura da chama de ar, pela acção de hidrogénio, produzindo iões e electrões que conduzem electricidade e podem ser detectados (Dias, 2009).

Um aspecto a salientar é o facto de nesta determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados em óleo de girassol ser necessário um pré tratamento da amostra por cromatografia em coluna, com gel de sílica prateada, antes da análise por cromatografia gasosa. Tal etapa é importante, visto que, a maioria dos óleos vegetais contém uma elevada quantidade de alcanos lineares, que dificultam a quantificação de parafinas minerais - que se apresentam numa bossa por baixo dos picos correspondentes aos *n*-alcanos - especialmente quando a concentração de óleo mineral presente na amostra é pequena. A

utilização de gel de sílica prateado permite ultrapassar esta limitação, uma vez que, retém *n*-alcanos de cadeia longa (Fiorini *et al*, 2010; Fiselier & Grob, 2009).

A técnica de cromatografia gasosa com detecção por *FID* foi a técnica eleita para este tipo de determinação, visto assumir-se que a resposta do detector *FID* é constante para todos os hidrocarbonetos alifáticos e este é um equipamento disponível na maioria dos laboratórios de análise de alimentos. Existem, no entanto, outros tipos de técnicas que podem ser usadas para efectuar esta determinação permitindo diminuir o tempo de análise, minimizando o consumo de solvente e a manipulação da amostra, mas que, no entanto, exigem equipamentos que não estão acessíveis à maioria dos laboratórios de análises alimentares e são extremamente caros. Exemplos de técnicas alternativas à cromatografia gasosa com detecção por *FID* são sistemas que acoplam cromatografia líquida a cromatografia gasosa (*LC-GC*) (Fiorini *et al*, 2010) ou sistemas que executam cromatografia gasosa a duas dimensões (*GC × GC*) (Ventura *et al*, 2008) ou a utilização de cromatografia gasosa a duas dimensões após pré separação em cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC - GC × GC*) (Biedermann & Grob, 2009) ou ainda um sistema que acopla *HPLC* – evaporação de solvente – *HPLC - GC FID* (Moret *et al*, 1996). Claro que, sistemas mais complexos permitem uma melhor caracterização da mistura de compostos que se denomina óleo mineral, possibilitando, para além da quantificação, a determinação da sua composição e portanto a identificação da origem de tal contaminação - contaminação por óleo mineral técnico ou de grau próprio para fins alimentares, o que uma técnica mais simples como *GC-FID* não permite.

II.9. Validação de um método analítico

A primeira razão da existência de um laboratório de análises químicas é a necessidade de obter resultados dessas mesmas análises, no entanto, esta missão só será cumprida se os resultados produzidos tiverem a qualidade adequada ao uso que lhes será dado. Assim, assume-se como princípio básico a validação de resultados:

“Um resultado para ser dado como válido tem de satisfazer os requisitos de qualidade que lhe sejam exigidos.” (Relacre, 1996).

O desenvolvimento, adaptação ou implementação de um método implica um processo de avaliação que permita estimar a sua eficiência na rotina do laboratório, ou seja, que permita assegurar que esse método possui as características adequadas para a obtenção de

resultados com a qualidade requerida para determinada situação. A este processo dá-se o nome de validação de um método analítico e implica a avaliação de diversos parâmetros, tendo sempre em conta a finalidade do método visado e os pré-requisitos estabelecidos.

Os requisitos mínimos para a validação de um método analítico dependem do tipo de método (Quadro VII) e compreendem o estudo de diversos parâmetros (Coordenação Geral de Acreditação, 2010), os quais serão abordados na validação levada a cabo neste trabalho:

- Selectividade;
- Linearidade/ Gama de trabalho;
- Limites analíticos (Limite de Detecção e Limite de Quantificação);
- Sensibilidade;
- Precisão (Repetibilidade, Reprodutibilidade e Precisão Intermédia);
- Exactidão;
- Robustez.

Quadro VII: Parâmetros de validação a avaliar conforme o tipo de ensaio.

Parâmetros	Tipo de ensaio			
	Qualitativo	Determinação do componente (analito) em maior teor	Análise de elementos menores e traços	Propriedades Físicas
Precisão		X	X	X
Selectividade	X	X	X	X
Exactidão		X	X	X
Robustez	X	X	X	X
Sensibilidade/ Linearidade/ Gama de Trabalho		X	X	X
Limite de detecção	X		X	
Limite de Quantificação			X	

Fonte: Coordenação Geral de Acreditação (2010).

De seguida será abordado, de forma sumária, cada um dos parâmetros de validação.

❖ **Selectividade**

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, sendo que, estes podem aumentar ou reduzir o sinal, sendo a magnitude desta interferência muitas vezes dependente da concentração.

A selectividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa, sem interferência dos outros componentes. Esta característica é essencialmente função do princípio de medida utilizado, mas depende, no entanto, do tipo de compostos a analisar (Relacre, 2000).

Um método diz-se específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias de que a grandeza medida provém apenas do analito (Relacre, 2000).

❖ **Linearidade, gama de trabalho, faixa linear e sensibilidade**

A quantificação num método analítico requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito, sendo que, este objectivo é conseguido pela calibração - processo pelo qual a resposta dum sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. A linearidade é, assim, obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática para o cálculo da concentração do analito a ser determinada numa amostra real, sendo a equação que relaciona estas duas variáveis:

$$y = a + b x$$

sendo:

y = resposta medida;

x = concentração;

a = ordenada na origem;

b = declive da curva analítica = sensibilidade.

Em geral, é usual recorrer-se a vários níveis de concentração (num mínimo de cinco) para a construção da curva analítica, sendo o número de replicados em cada nível de concentração dependente da rotina do laboratório (Relacre, 2000).

A linearidade do método pode ser observada pela representação dos resultados dos ensaios em função da concentração de analito e verificada a partir da equação da regressão linear, que é determinada pelo método dos mínimos quadrados. Para atingir este objectivo deve ser verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração e ainda a homocedasticidade – homogeneidade de variâncias - dos dados (Coordenação Geral de Acreditação, 2010).

Alguns procedimentos analíticos não demonstram linearidade, mesmo após a utilização de ferramentas de transformação linearizante, sendo, nestes casos, a resposta analítica descrita por uma outra função que modela a concentração de analito na amostra.

Para além disto, para qualquer método analítico, existe uma gama de trabalho, ou seja, uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade, para a qual o método em causa pode ser aplicado. A gama de trabalho deve abranger a gama de aplicação para a qual o ensaio vai ser utilizado e a concentração mais esperada ou mais relevante deve, sempre que possível, situar-se no centro da gama de trabalho. No limite inferior da gama de trabalho, o factor limitante é o valor do limite de quantificação e no limite superior, o factor limitante está relacionado com o sistema de resposta do equipamento de medição. Em alguns casos específicos poderá existir dentro da faixa de trabalho uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal correspondente ao analito terá uma relação linear com o analito ou propriedade em análise (Coordenação Geral de Acreditação, 2010).

Quer a análise da gama de trabalho, quer da linearidade do método devem ser encaradas como um estudo que deve ser realizado durante a fase de validação/implementação do método de ensaio ou sempre que se justifique. No entanto, quando a gama de trabalho se encontra claramente definida em referência bibliográfica reconhecida, pode tornar-se desnecessário a sua análise. Isto é, em rotina, apenas a linearidade da curva de calibração utilizada num determinado método analítico deverá ser avaliada através da sua representação gráfica, juntamente com a análise do coeficiente de correlação (Coordenação Geral de Acreditação, 2010; Relacre, 2000).

Relativamente à sensibilidade do método utilizado numa determinação, esta pode ser definida como o quociente entre o acréscimo do valor lido e a variação da concentração correspondente a esse acréscimo. Esta característica avalia a capacidade do método ou

equipamento em questão distinguir pequenas diferenças de concentração do analito, ou seja, a sensibilidade é a derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de concentração (Relacre, 2000).

Esta grandeza tem grande interesse pelo seu aspecto relativo, ou seja, quando se pretende averiguar a evolução da sensibilidade ao longo do tempo ou quando se compara a sensibilidade de vários métodos analíticos, baseados em modelos lineares, para o mesmo analito ou ainda quando se compara a sensibilidade para vários analitos diferentes.

❖ Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção é o teor mínimo a partir do qual é possível detectar a presença do analito, com uma certeza estatística razoável. Ou seja, este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detectada numa amostra, mas não necessariamente quantificada com valor exacto. De salientar que, uma leitura inferior ao limite de detecção não significa, obviamente, a ausência de analito a medir, apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente a analisar será inferior a um certo valor (IPAC, 2005; Relacre, 2000).

Em termos qualitativos, este conceito corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, ou seja, de uma amostra que contém a mesma matriz mas não contém o analito.

Estatisticamente, para a correcta definição do limite de detecção é necessário introduzir dois conceitos simples:

- erro do tipo I, que é a probabilidade de concluir pela presença do componente em análise quando de facto não existe esse componente na amostra;
- erro do tipo II, que é a probabilidade de concluir pela ausência do componente em análise, quando ele de facto existe.

Sendo que, para uma correcta análise dos limiares analíticos, estes dois tipos de erros têm de ser minimizados (Relacre, 2000).

❖ Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação corresponde à menor quantidade medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada precisão e exactidão. Na prática, este limiar analítico corresponde ao padrão de calibração de menor concentração, excluindo o branco (IPAC, 2005).

A actualização dos limiares analíticos – limite de detecção e limite de quantificação – deverá ser efectuada sempre que ocorram alterações de factores de influência, tais como mudança de analista, alteração dos reagentes ou equipamentos usados na determinação, entre outros, ou sempre que se elabora uma nova curva de calibração, e se utiliza os dados da mesma para o cálculo dos limiares, sendo que, poderá ser feito um estudo ao longo do tempo e adoptar como limiares analíticos a média aritmética dos limites de detecção e quantificação calculados recorrendo a uma série significativa de curvas de calibração, desde que se observe estabilidade nos valores dos limiares obtidos ao longo do tempo (Relacre, 2000).

❖ Precisão

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Um factor importante a salientar é que será mais realista o estudo da precisão do método usando amostras, com a finalidade de minimizar o efeito de matriz (Coordenação Geral de Acreditação, 2010; Relacre, 2000).

Para a avaliação da dispersão dos resultados existem duas medidas extremas, a repetibilidade e a reprodutibilidade, sendo que entre estas duas existe uma situação intermédia, que se designa precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial.

A repetibilidade exprime a precisão de um método efectuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efectuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como, o mesmo laboratório, o mesmo analista, o mesmo equipamento e mesmo tipo de reagentes, em curtos intervalos de tempo. Estes ensaios permitem calcular o limite de repetibilidade, que é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95 %), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos em condições de repetibilidade (Eurachem, 1998; Relacre, 1996; Relacre, 2000).

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efectuado em condições de ensaio diferentes, ou seja, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre a mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como, diferentes laboratórios, diferentes operadores, diferentes equipamentos e/ou diferentes épocas. Também para o caso da reprodutibilidade é possível calcular o respectivo limite, que é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95 %) a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos em condições de reprodutibilidade (Eurachem, 1998; Relacre, 1996; Relacre, 2000).

Embora a determinação da reprodutibilidade não seja executada por um único laboratório, é considerado um parâmetro importante quando um laboratório procura a verificação de desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial.

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exactamente quais as condições a variar (uma ou mais), de entre diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes tempos. Esta medida da precisão representa a variabilidade dos resultados num laboratório (Eurachem, 1998; Relacre, 1996; Relacre, 2000).

Um outro modo alternativo de estudar a precisão de um método consiste na comparação da precisão entre métodos, ou seja, consiste na comparação dos resultados obtidos utilizando o método a ser validado com os resultados conseguidos através de um método de referência validado. O objectivo desta comparação é estudar o grau de proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos, sendo as análises efectuadas em replicado, utilizando os dois métodos em separado, sobre as mesmas amostras, em toda a gama de concentrações em que se pretende validar o método (Relacre, 2000).

❖ **Exactidão**

A exactidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência convencionalmente aceite como verdadeiro. Este termo, quando aplicado a uma série de resultados de ensaios implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. Os processos normalmente empregues para avaliação da exactidão de uma metodologia são, entre outros, a análise de materiais de referência, a participação em

ensaios interlaboratoriais ou em testes comparativos (Coordenação Geral de Acreditação, 2010; Relacre, 2000).

Relativamente aos Materiais de Referência Certificados (MRC) estes devem, sempre que possível ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio e constituem uma excelente ferramenta no controlo externo de qualidade de uma análise química. Um MRC tem um valor de concentração (ou outra grandeza de interesse) para cada parâmetro e uma incerteza associada. O uso correcto desta ferramenta consiste na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório, sendo que, os valores obtidos pelo mesmo - média e desvio padrão amostral de uma série de ensaios em replicado - devem ser comparados com os valores certificados do material de referência. Quando o valor obtido não estiver contido no intervalo de incerteza indicado para o valor certificado, deve-se procurar as causas para esse desvio e tentar eliminá-las ou minimizá-las, podendo em caso de não as conseguir eliminar, aceitá-las, uma vez que, cada laboratório pode adoptar critérios de aceitação diferentes para a aceitação dos resultados dos MRC (Coordenação Geral de Acreditação, 2010; Relacre, 1996; Relacre, 2000).

Para além do uso de materiais de referência certificados, para avaliação de um determinado método de ensaio pode desenvolver-se um circuito interlaboratorial, existindo vários tipos consoante o objectivo a que se destinam:

- Ensaio Interlaboratorial de Aptidão, que se destina a avaliar o desempenho dos laboratórios participantes, estando normalmente associado a um MRC, podendo geralmente os participantes usar o método que entenderem;
- Ensaio Interlaboratorial de Normalização, que se destina a estudar as características de um método de análise, nomeadamente a sua reprodutibilidade e repetibilidade, sendo que neste caso, uma condição de acesso é a utilização exclusiva do método em causa (Relacre, 2000).

Os testes comparativos, tal como no caso da precisão, são um contributo importante na validação de um método interno de ensaio, em que se procede à comparação de resultados obtidos a partir desse método com os resultados obtidos através de um método de referência. O objectivo principal deste tipo de ensaio é o de estudar a proximidade de resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, isto é, avaliar a exactidão do método interno em validação, relativamente ao de referência (Relacre, 2000).

Para além das possibilidades mencionadas anteriormente, a exactidão do método pode ainda ser avaliada recorrendo a ensaios de recuperação, em que a recuperação do analito em estudo pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). As amostras podem ser fortificadas com o analito em diferentes concentrações, por exemplo, em baixa, média e alta concentração, de acordo com a gama de trabalho a que o método se aplica. A limitação deste procedimento é o facto de o analito adicionado não estar necessariamente na mesma forma que se apresentaria na amostra, sendo que, a presença de analitos adicionados numa forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente optimistas da recuperação (Coordenação Geral de Acreditação, 2010; Eurachem, 1998; Relacre, 2000).

❖ Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que o mesmo apresenta face a pequenas variações, sendo que, um método se diz robusto se se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando está a ser executado. Convém ainda salientar que quanto maior for a robustez de um determinado método, maior será a confiança desse relativamente à sua precisão (Coordenação Geral de Acreditação, 2010; Eurachem, 1998; Relacre, 2000).

Para determinar a robustez de um método de ensaio pode-se recorrer ao teste de *Youden* (Coordenação Geral de Acreditação, 2010; Relacre, 2000), que se trata de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também seriar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência (por excesso ou por defeito) de cada uma dessas variações.

Finalmente, convém salientar que todos os dados relevantes no processo de validação – planeamento, experiência e resultados obtidos – devem ser documentados e registados de forma a possibilitar a rastreabilidade de todo o processo, sendo esta documentação de validação importante para fins de avaliação do método e pode também ser exigida em alguns casos específicos, como por exemplo, por organismos reguladores. Após o processo de validação, é de extrema importância a elaboração de um procedimento operacional para que o método possa ser implementado de maneira clara e sem ambiguidades, sendo que, a documentação apropriada auxilia a aplicação consistente do método, permitindo que, o

desempenho real do mesmo corresponda ao previsto na validação. O que se pretende é que a documentação minimize a introdução de variações acidentais no método. Esta documentação deve ser clara, precisa e concisa, dentro dos limites estabelecidos pelo campo de aplicação (Coordenação Geral de Acreditação, 2010; Eurachem, 1998; Relacre, 2000).

III. Parte experimental

Para a implementação/validação do método de ensaio interno, para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados em óleo de girassol por cromatografia gasosa, foram analisados vários parâmetros, utilizando sempre o mesmo procedimento experimental para efectuar cada uma das análises. O procedimento adoptado neste trabalho, e que será descrito mais à frente neste capítulo, foi desenvolvido pelo *Instituto de La Grasa* (Sevilha) em 2008.

III.1. Materiais e reagentes

III.1.1. Materiais

- Coluna de vidro, para cromatografia em coluna, de aproximadamente 15 mm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento, provida de placa de porcelana e torneira no extremo inferior;
- Balança técnica com precisão de 0,1 g (*Sartorius* BL 3100);
- Balança analítica com precisão de 0,0001 g (*Sartorius Basic* BA 210 S);
- Evaporador rotativo (*Büchi* com banho *arsplus* e bomba *Rietschle*);
- Cromatógrafo gasoso com injeção on column para colunas capilares, forno de temperatura programável e detector *FID* (*Perkin Elmer* 8600);
- Sistema de tratamento de dados com capacidade de integração manual (*Turbochrom Navigator* e *Clarity*);
- Coluna capilar de sílica fundida de 15 metros de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,10 µm de espessura de filme (*Sugelabor*, SGL – 5);
- Microseringa de capacidade 5 µL, provida de agulha adequada para injeção on column (*SGE Analytical Science*);
- Material de vidro recorrente em laboratório.

III.1.2. Reagentes

- Gel de sílica para cromatografia em coluna de granulometria compreendida entre 60 e 200 µm (70 – 230 mesh) (*Merck*);
- Nitrato de prata de pureza analítica (*Panreac*, 99,8 % de pureza);
- Sulfato de sódio anidro de pureza analítica (*Panreac*, 99,0 % de pureza);

- Areia de mar lavada (*Riedel de Haën*);
- *n*-eicosano (*Fluka Analytical*, 99,8 % de pureza);
- *n*-hexano para cromatografia (*Panreac*, 99,0 % de pureza);
- *n*-hexano de pureza analítica (*Panreac*, 99,0 % de pureza);
- *n*-heptano de pureza analítica (*Fisher Scientific*, 96,86 % de pureza);
- Parafina líquida (*Merck*).

III.2.Procedimento Experimental

III.2.1. Preparação de gel de sílica prateado

Para a preparação de gel de sílica prateado (suficiente para três colunas) pesou-se 4,5 g de nitrato de prata e dissolveu-se esta quantidade em 6 mL de água destilada. Pesou-se, de seguida, 45 g de gel de sílica num balão de fundo redondo de 500 mL, forrado exteriormente com papel de alumínio, e com a ajuda de uma pipeta *Pasteur*, adicionou-se gota a gota, agitando, a solução de nitrato de prata em água, preparada anteriormente. Em seguida, colocou-se o balão no evaporador rotativo, funcionando este apenas em modo de agitação, durante 30 minutos. Após este tempo procedeu-se à colocação do conteúdo do balão num frasco de vidro opaco, também este envolto em papel de alumínio, ficando o mesmo no escuro durante 12 horas, até poder ser usado na preparação das colunas cromatográficas para o pré-tratamento.

III.2.2. Preparação da coluna cromatográfica de pré-tratamento

Anteriormente à preparação da coluna de vidro provida de placa de porcelana na parte inferior, utilizou-se uma pequena quantidade de *n*-hexano para a lavagem da mesma. Pesou-se de seguida num copo 18,5 g de gel de sílica prateado e misturou-se esta quantidade em 40 mL de *n*-hexano. Verteu-se, depois, esta mistura, para a coluna aplicando vibrações, com a finalidade de eliminar possíveis bolhas de ar. Logo de seguida envolveu-se a coluna em papel de alumínio. Adiciona-se à coluna, sobre o gel de sílica, aproximadamente 0,5 cm de sulfato de sódio anidro e depois 1 cm de areia de mar lavada. Elimina-se, seguidamente, o excesso de solvente de eluição.

III.2.3. Fraccionamento do óleo

Na etapa de fraccionamento do óleo, pesou-se num copo, 1 g do óleo e adicionou-se 1 mL da solução padrão de *n*-eicosano 0,05 mg/kg (preparada pesando 0,0050 g de padrão *n*-eicosano num escorredor, sendo esta quantidade posteriormente transferida para um balão de 100 mL, perfazendo-se o volume com *n*-hexano específico para cromatografia). Com a ajuda de uma pipeta *Pasteur* transferiu-se a mistura para o topo da coluna cromatográfica. Desprezou-se o volume correspondente a esta mistura, ou seja, deixou-se correr a mistura até ao topo da camada de areia de mar lavada, não procedendo à recolha do volume correspondente para posterior análise no cromatógrafo. Adicionou-se, de seguida, por duas vezes, 1 mL de *n*-hexano ao copo de pesagem e adicionou-se com a mesma pipeta *Pasteur* estes volumes à coluna cromatográfica, sendo que também se desprezaram estes dois volumes. Seguidamente, colocou-se um balão de fundo redondo de 100 mL no extremo da coluna e adicionou-se 55 mL de *n*-hexano, procedendo-se à eluição dos compostos de interesse, a um ritmo de 15 gotas por cada 10 segundos.

Após recolhido o volume de eluição procedeu-se à evaporação do solvente no evaporador rotativo, a pressão reduzida e num banho de aproximadamente 30 °C. Para eliminar possíveis vestígios de solvente utilizou-se uma corrente de azoto, dissolvendo-se em seguida o resíduo obtido em 0,5 mL de *n*-heptano.

III.2.4. Separação cromatográfica

O resíduo dissolvido em 0,5 mL de *n*-heptano é a base da análise cromatográfica, utilizando-se 2 µL desta mistura na análise por cromatografia gasosa.

As condições cromatográficas básicas utilizadas são:

- Temperatura do forno: inicialmente a 60 °C durante 1 minuto, após o qual a temperatura começa a aumentar a uma razão de 12 °C/minuto até aos 350 °C, temperatura que se mantém durante 4 minutos (Figura 11);
- Pressão de hidrogénio na cabeça de coluna: 15 psi (105 kPa);
- Temperatura do detector: 350 °C;
- Volume de injeção: 2 µL.

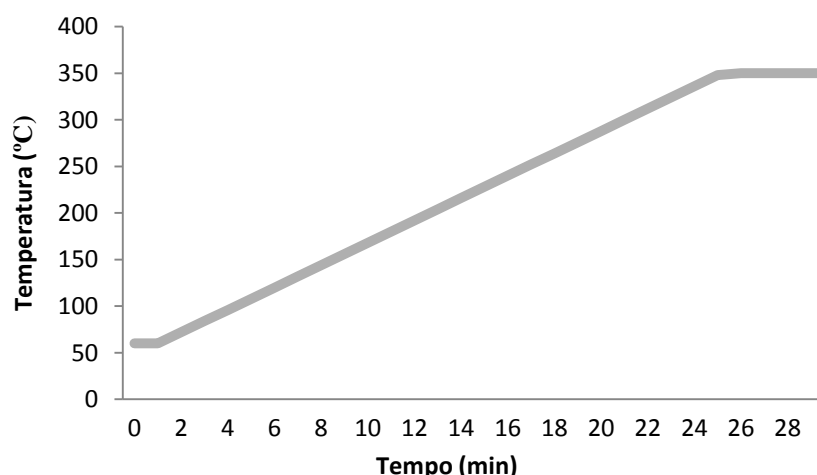


Figura 11: Rampa de temperatura do forno, na análise cromatográfica de óleo mineral.

III.2.5. Determinações quantitativas

No cromatograma que se obtém da análise cromatográfica da fracção eluída da cromatografia em coluna com gel de sílica, deverá observar-se um pico estreito e bem definido, que tem início e termina na linha de base, correspondente ao pico do padrão interno. Se a amostra possuir contaminação com óleo mineral deverá aparecer um pico largo correspondente a uma mistura complexa mal resolvida, que terá sobre ela outros picos estreitos e bem definidos, correspondentes a hidrocarbonetos alifáticos normais num óleo. Assim, a área de interesse num cromatograma deste tipo é a correspondente ao pico da mistura mal resolvida.

Para avaliar quantitativamente o conteúdo em hidrocarbonetos alifáticos saturados de origem mineral, primeiro é necessário determinar a concentração de hidrocarbonetos alifáticos saturados totais. Para tal, procede-se à integração do pico correspondente ao padrão interno e ao pico correspondente à mistura mal resolvida, contabilizando todo o pico desde o seu começo até atingir novamente a linha de base. É ainda de salientar o facto de que, o pico do padrão interno pode aparecer sobre o pico da mistura mal resolvida e nesse caso integra-se juntamente com esse pico largo. Através dessas áreas e aplicando a expressão 1 procede-se ao cálculo dos hidrocarbonetos alifáticos totais:

$$H.A_{Totais} = \frac{A_x \times m_p \times 1000}{A_p \times m_a} \quad [1]$$

onde:

- A_x é a área de todos os picos menos a área do padrão interno;
- A_p é a área do pico correspondente ao padrão interno;
- m_p é a massa do padrão interno adicionado ao óleo em miligramas ($m_p = 0,05$ mg);
- m_a é a massa de óleo analisada em gramas.

Depois de calculada a fracção correspondente aos hidrocarbonetos alifáticos saturados totais, é necessário proceder ao cálculo da fracção de hidrocarbonetos alifáticos saturados normais num óleo. Este cálculo é efectuado recorrendo novamente à área do padrão interno e à área dos picos correspondentes a hidrocarbonetos alifáticos normais num óleo, que são os picos que se situam por cima da banda larga da mistura mal resolvida. Assim, procede-se à integração de todos os picos que aparecem sobre a banda larga, correspondente à mistura mal resolvida e aplica-se novamente a expressão 1 para este cálculo, obtendo-se os hidrocarbonetos alifáticos normais num óleo ($H.A.Normais$).

Finalmente, a fracção correspondente a hidrocarbonetos alifáticos saturados de origem mineral, ou mais simplesmente a óleo mineral obtém-se subtraindo as duas fracções determinadas anteriormente (Expressão 2).

$$H.A.Origem Mineral = H.A.Totais - H.A.Normais \quad [2]$$

O resultado obtido vem expresso em termos de mg.kg^{-1} (ppm).

III.3. Análises efectuadas

O procedimento base utilizado para todas as determinações efectuadas foi o mencionado anteriormente, procedendo-se à determinação dos seguintes parâmetros:

III.3.1. Limiares analíticos

Para a determinação dos limiares analíticos foram efectuados dez replicados de um branco contaminado com 15 mg.kg^{-1} de parafina líquida.

III.3.2. Curva de calibração

Para determinar a curva de calibração associada a esta medição foram utilizados brancos contaminados com diferentes concentrações de parafina líquida: 22,5 mg.kg⁻¹; 30 mg.kg⁻¹; 37,5 mg.kg⁻¹; 45 mg.kg⁻¹; 52,5 mg.kg⁻¹ e 60 mg.kg⁻¹. Para cada concentração analisada foram efectuados três replicados.

III.3.3. Repetibilidade

A repetibilidade é determinada pela análise no mesmo dia, utilizando o mesmo equipamento e a mesma analista, dez replicados de uma amostra de óleo de girassol refinado, sem qualquer contaminação propositada.

III.3.4. Exactidão

Nos estudos de exactidão foram analisadas, em ensaios de recuperação, amostras de óleo de girassol – bruto e refinado – e de óleo de soja – bruto e refinado – sendo as determinações efectuadas em duplicado para cada amostra. Nestes ensaios de recuperação é analisada a amostra sem contaminação propositada – mas que poderá naturalmente possuir contaminação com óleo mineral – e ainda a amostra no estado natural propositadamente contaminada com 50 mg.kg⁻¹ de parafina.

Em termos de ensaios interlaboratoriais foram efectuados apenas dois ensaios deste tipo, por motivos de custos. Um deles foi efectuado com uma amostra de óleo de girassol refinado, compreendendo cinco laboratórios, incluindo o LET e uma amostra de óleo de soja bruto, compreendendo apenas três laboratórios, também incluindo o LET.

III.3.5. Robustez

Para avaliar a robustez do método em estudo foram efectuados ensaios utilizando dois métodos de integração diferentes - por motivos de avaria irreparável no computador utilizado para estas determinações, foi necessário utilizar dois métodos de integração diferentes, o que possibilita este tipo de comparações, que noutras circunstâncias seria impossível de realizar por motivo dos custos associados. Neste ponto foi avaliado um ensaio efectuado com um branco contaminado com 15 mg.kg⁻¹ de parafina.

Para avaliar a robustez foram ainda analisadas amostras de óleo de girassol refinado e um branco, tanto efectuando o procedimento experimental com *n*-hexano de pureza analítica, como com *n*-hexano específico para cromatografia.

Ainda foi efectuada uma análise com uma amostra de óleo de girassol bruto contendo impurezas suspensas, quer ao natural, quer recorrendo a filtração da mesma, para comparação de resultados.

Para a comparação entre métodos foi utilizado o método estabelecido pela Norma ISO para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos em óleos vegetais, que ainda é apenas um rascunho, estando em fase de discussão para posterior aprovação. Neste ponto foram analisadas em triplicado duas amostras, uma delas de óleo de girassol bruto e outra de óleo de girassol refinado e ainda, em duplicado, uma amostra de óleo de soja bruto.

IV. Resultados e discussão

Para a validação do método interno de ensaio para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados, por cromatografia gasosa em coluna capilar, com injeção *on column* e detector *FID* foram analisados cinco parâmetros principais de validação, que compreendem a gama de trabalho/linearidade do método, os limiares analíticos do mesmo (limites de detecção e de quantificação), a precisão e exactidão do método (incluindo a primeira, o estudo da repetibilidade e precisão intermédia e a segunda, a execução de ensaios de recuperação e a realização de um circuito interlaboratorial), e ainda a avaliação da robustez do método em causa, com comparação entre dois métodos distintos de ensaio.

Convém primeiramente salientar que o método usado no desenvolvimento deste trabalho é um método interno - método que não segue uma norma de ensaio nacional ou internacional ou algum documento normativo equivalente - uma vez que, apesar de actualmente já existir uma Norma ISO para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos em óleos vegetais, esta ainda não foi aprovada, encontrando-se em discussão. À data de início da elaboração deste trabalho experimental, tal norma ainda não havia sido divulgada. No entanto, tendo em conta que após ser aprovada, a referida Norma ISO será a referência para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos em óleos vegetais, esta será usada em algumas comparações neste trabalho.

O método sobre o qual recai este estudo de validação é específico para a determinação da contaminação por óleo mineral, em óleo de girassol. No entanto, existem também muitas amostras de óleo de soja a analisar para este parâmetro de qualidade, pelo que, sempre que possível, este estudo será feito também para o óleo de soja. Convém, ainda assim, salientar que o objectivo principal deste trabalho é a validação do método para óleo de girassol.

Para além dos parâmetros avaliados experimentalmente neste trabalho, a validação de um método de ensaio compreende ainda a apreciação da selectividade e especificidade do mesmo. A selectividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa, sem interferência dos outros componentes, enquanto a especificidade é a característica que um método deve ter para permitir discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, garantir que a grandeza medida provém apenas do analito. No entanto, tendo em conta a natureza da determinação implicada neste trabalho, em que o objecto de interesse não é um composto, mas um conjunto de compostos que originam não um pico, mas uma banda larga – procedente da falta de capacidade da cromatografia gasosa para distinguir cada um dos

compostos que compõem a mistura que se denomina óleo mineral - a determinação destes parâmetros tem pouco significado. Ainda assim, através da realização de um ensaio em branco (Anexo A – Figura A1) e outros após fortificação com parafina líquida (Anexos A – Figura A2 à A7) verifica-se que o sinal em forma de banda larga, que aparece num cromatograma derivado de uma análise de óleo contaminado com hidrocarbonetos alifáticos de origem mineral corresponde a óleo mineral, aparecendo esta banda apenas quando existe fortificação do branco. O branco correspondente desta análise não apresenta qualquer sinal em termos de óleo mineral.

Relativamente aos cinco parâmetros de validação/implementação de um método de ensaio interno avaliados neste trabalho, serão analisados um a um ao longo deste capítulo.

IV.1. Curva de calibração e sensibilidade

Em análises quantitativas a calibração indica um processo pelo qual a resposta dum sistema de medida se relaciona com a concentração ou quantidade de substância conhecida. Neste trabalho experimental a concentração conhecida dos padrões de parafina líquida foi correlacionada quer com áreas normalizadas correspondentes a óleo mineral - ou seja, a razão entre a área correspondente a óleo mineral e a área do padrão interno - quer com o sinal obtido em termos de área de óleo mineral, sem normalização. A relação mais simples, utilizaria como variáveis a relacionar a concentração conhecida dos padrões de parafina líquida e o sinal obtido em termos de área correspondente a óleo mineral, no entanto, verificou-se (Figura 12) que esta correlação é mais fraca, tendo o padrão interno um papel importante, que não seria contabilizado numa relação deste tipo. Assim, torna-se mais realista a utilização de valores de área normalizada correspondentes a óleo mineral (Figura 13), em que se entra em linha de conta com a área correspondente ao padrão interno. O que se verifica é que o padrão interno tem um papel importante neste método, visto que, podem existir pequenas variações no sinal obtido para óleo mineral em duas análises cromatográficas da mesma amostra, que serão acompanhadas por variação proporcional no sinal obtido para o padrão interno. Este funciona, assim, como uma referência em termos de resposta – área correspondente de óleo mineral – logo necessita de ser contabilizado nestes cálculos.

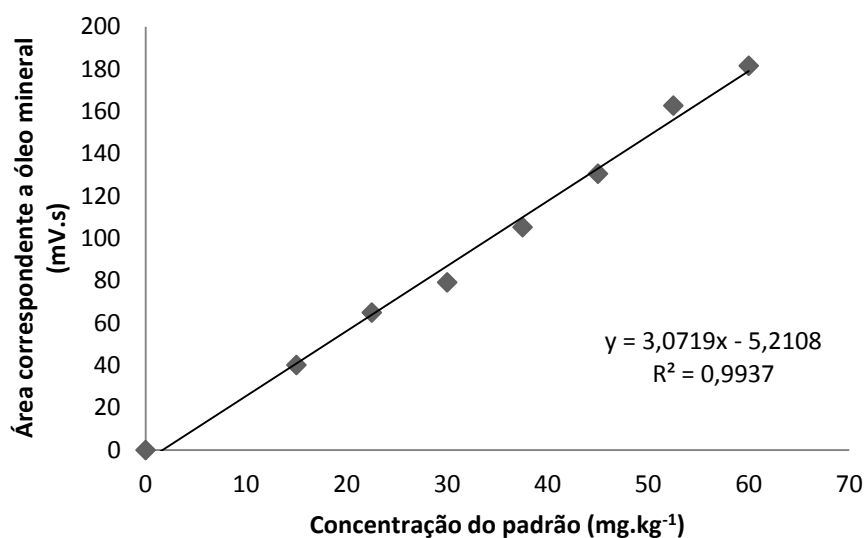


Figura 12: Correlação entre concentração de padrões de parafina e sinal obtido em termos de área correspondente a óleo mineral.

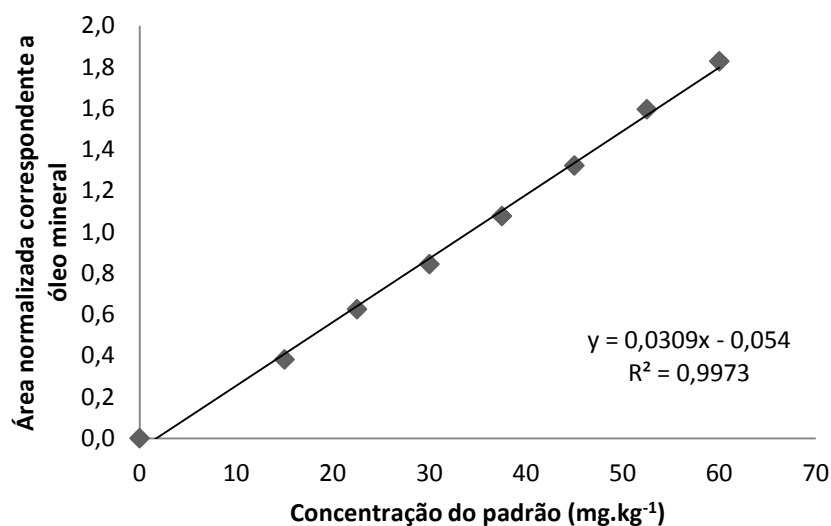


Figura 13: Correlação entre concentração de padrões de parafina e área normalizada correspondente a óleo mineral.

Considerando, assim, áreas normalizadas correspondentes a óleo mineral e analisando sete diferentes concentrações de parafina líquida (Anexo A), obtêm-se uma correlação linear positiva entre as duas variáveis, com um coeficiente de determinação de 0,9973, o que significa que uma elevada percentagem da variância (99,7 %) é explicada pela regressão efectuada. A equação que descreve a relação entre as duas variáveis, obtida pelo método dos mínimos quadrados, é:

$$\text{Área normalizada} = 0,0309 \times \text{concentração} - 0,054$$

Esta relação é válida apenas para concentrações entre os 15 mg.kg⁻¹ e os 60 mg.kg⁻¹, visto que foi para esta gama de trabalho que foi avaliada a linearidade do método. Para além destas concentrações estaremos perante extrapolações, pelo que, só se deverá recorrer a esta relação, quando o sinal obtido se encontrar dentro da gama, caso contrário dever-se-á proceder a uma diluição da amostra.

A escolha da gama de trabalho foi feita tendo em conta que deveria conter o valor de 50 mg.kg⁻¹, que é o limite legal para este tipo de compostos no óleo de girassol (Karasek *et al*, 2010), portanto, e por uma questão de gestão de recursos, não foram analisados padrões acima dos 60 mg.kg⁻¹. Acima dos 50 mg.kg⁻¹ considera-se que o óleo em causa se encontra fora dos requisitos impostos por lei, pelo que, a quantificação precisa se torna pouco importante. Para além disso, a maioria das amostras deverão possuir valores de contaminação abaixo dos 50 mg.kg⁻¹, pelo que, se torna importante que, a maior densidade de pontos da recta, se situe abaixo desse valor. Para a elaboração da recta de calibração, o primeiro padrão considerado, para além do branco, é a menor concentração passível de análise em cromatografia gasosa com as condições utilizados no laboratório, tendo em conta o equipamento usado e o software de análise de dados disponível. Complementarmente, procedeu-se à escolha dos restantes padrões de calibração de forma a permitir uma distribuição equitativa dos mesmos pela recta.

Tendo em conta que a recta de calibração obtida é uma função polinomial do primeiro grau, isto é, uma recta, e como se utilizou o método dos mínimos quadrados para a regressão linear, assume-se o pressuposto de que os erros possuem uma distribuição normal e que existe homogeneidade das variâncias ao longo da recta obtida.

Convém ainda salientar que é desejável que a calibração analítica seja efectuada aquando da análise, no entanto, quando não é efectuada a recta de calibração diária, para cada série de amostras analisadas, dever-se-á proceder a um estudo mais pormenorizado da linearidade do método, através de uma análise alargada, ao longo do tempo, de várias rectas de calibração, com a finalidade de, perante um histórico das mesmas, demonstrar-se a existência de estabilidade. Esta análise mais alargada não foi efectuada neste trabalho por uma questão de tempo.

O facto deste método fazer uso de um padrão interno implica que não seria necessário o recurso a uma recta de calibração, dado que este já funciona como uma referência para validação dos resultados obtidos em cada análise, no entanto, para verificação da linearidade e sensibilidade deste método, tal análise é necessária.

Para além da avaliação da linearidade do método utilizado, esta determinação serve ainda para avaliar outro parâmetro, a sensibilidade do método. A sensibilidade pode ser definida como o quociente entre o acréscimo do valor lido e a variação da concentração correspondente a esse acréscimo, ou seja, como a recta de calibração é definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive da recta de calibração. Assim, a sensibilidade deste método, nas condições usadas neste trabalho, toma o valor de $0,0309 \text{ kg.mg}^{-1}$. Esta característica avalia a capacidade do método para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito e é particularmente importante quando se pretende averiguar a evolução desta grandeza ao longo do tempo ou quando se compara a sensibilidade de vários métodos diferentes, baseados em modelos lineares, para o mesmo analito ou ainda quando se compara a sensibilidade para vários analitos. Apesar de não existirem referências na literatura à sensibilidade dos métodos utilizados, esta grandeza poderá vir a ser importante para posteriores comparações, ou mesmo para que o laboratório tenha controlo deste parâmetro ao longo do tempo, através da elaboração de novas rectas de calibração.

Ainda através da informação veiculada pela recta de calibração obtida, é possível determinar o desvio padrão do método (S_m), que é uma característica que permite ao analista verificar a qualidade do seu trabalho experimental e ainda o coeficiente de variação (CV_m) do método utilizado. O desvio padrão do método (Relacre, 2000) é dado por:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{b}$$

onde:

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual associado à recta de regressão, que estima a precisão de um resultado obtido recorrendo a essa recta de calibração e é dado por:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + b \cdot x_i)]^2}{N - 2}}$$

- b é o declive da recta de regressão.

Assim, como o desvio padrão residual associado à recta de regressão toma um valor de 0,1307 e o declive da recta é $0,0309 \text{ kg.mg}^{-1}$, o desvio padrão do método é de $4,23 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Obtido este valor é possível calcular o coeficiente de variação do método (CV_m), expresso em percentagem (Relacre, 2000):

$$CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100$$

onde:

- S_m é o desvio padrão do método;
- \bar{x} é a média das concentrações utilizadas nos padrões de calibração.

Assim, o coeficiente de variação do método é de aproximadamente 13 %. Tendo em conta que se definiu internamente uma possível variação de 10 %, este valor está um pouco acima de tal critério, não sendo no entanto, um valor demasiado elevado, tendo em conta a natureza do método.

Quadro VIII: Compilação dos resultados de avaliação de qualidade do método usado.

Parâmetros da recta de regressão
Ordenada na origem (a) = 0,054 Declive da recta (b) = 0,0309
Parâmetros de avaliação de desempenho do método
Desvio padrão residual associado à recta de regressão ($S_{y/x}$) = 0,1307 Desvio padrão do método (S_m) = 4,23 mg.kg ⁻¹ Coeficiente de variação do método (CV_m) = 13 %

Atendendo à informação veiculada nas referências bibliográficas consultadas, não são mencionados valores de desvio padrão residual associado à regressão ou do coeficiente de variação dos métodos utilizados. Estes valores seriam importantes para posteriores comparações aquando da análise da evolução da linearidade ao longo do tempo, com a execução de várias rectas de calibração.

IV.2. Limiares analíticos

Existem várias formas de determinar os limiares analíticos de um método de ensaio (Eurachem, 1998; IPAC, 2005), sendo que, neste subcapítulo serão abordadas duas maneiras distintas de efectuar esta determinação.

Em relação aos limites de detecção e de quantificação, os resultados obtidos nos dez replicados, analisados independentemente e em dia distintos (Anexo B), encontram-se especificados no Quadro IX.

Quadro IX: Resultados obtidos (em mg.kg^{-1}) nos dez replicados para determinação dos limiares analíticos.

Ensaio	Resultado (mg.kg^{-1})
1	19,580
2	18,529
3	19,085
4	18,549
5	19,711
6	19,408
7	19,486
8	18,923
9	18,376
10	19,233
Média	19,088
Desvio padrão	0,477

O cálculo do limite de detecção (LD) é feito através da expressão (IPAC, 2005; Relacre, 2000):

$$LD = X_0 + K \sigma_0$$

onde:

- X_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo de forma mais fiel possível uma situação de rotina;
- σ_0 é o desvio padrão associado a X_0 ;
- Se a lei de probabilidade de X_0 é suficientemente conhecida e partindo do princípio que é gausseana (distribuição normal dos erros) então K toma o valor de aproximadamente 3,3 para um nível de confiança de cerca de 97,5 %.

Assim, o limite de detecção toma o valor de $20,7 \text{ mg.kg}^{-1}$, ou seja, o teor mínimo a partir do qual é possível detectar a presença de analito com uma certeza estatística razoável (aproximadamente 97,5 %), para este método específico, é de aproximadamente 21 mg.kg^{-1} .

Dado que foi elaborada uma recta de calibração para este método, o valor do limite de detecção pode também ser determinado recorrendo a essa informação, utilizando a expressão (IPAC, 2005; Relacre, 2000):

$$LD = \frac{[3,3 \cdot S_{y/x}]}{b}$$

onde:

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da recta de calibração;
- b é o declive dessa mesma recta.

Tendo em conta o valor do desvio padrão residual associado à recta de regressão, calculado anteriormente ($S_{y/x} = 0,1307$), o limite de detecção, determinado por este método, é de aproximadamente 14 mg.kg^{-1} .

Relativamente ao limite de quantificação (LQ), este é calculado de forma semelhante ao limite de detecção (IPAC, 2005; Relacre, 2000):

$$LQ = X_0 + 10 \sigma_0$$

onde:

- X_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo de forma mais fiel possível uma situação de rotina;
- σ_0 é o desvio padrão associado a X_0 .

O limite de quantificação, ou seja, a menor concentração a partir da qual é possível a quantificação do analito, toma o valor de $23,9 \text{ mg.kg}^{-1}$, aproximadamente 24 mg.kg^{-1} .

Também o valor do limite de quantificação pode ser estimado a partir dos parâmetros associados à recta de regressão obtida, ou seja, através da expressão (IPAC, 2005; Relacre, 2000):

$$LQ = \frac{[10 \cdot S_{y/x}]}{b}$$

onde:

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da recta de calibração;
- b é o declive dessa mesma recta.

Utilizando o desvio padrão residual associado à recta de regressão calculado anteriormente ($S_{y/x} = 0,1307$), o limite de quantificação, determinado por este método, é de aproximadamente 42 mg.kg^{-1} .

Quadro X: Súmula dos valores obtidos para os limites de detecção e de quantificação pelos dois métodos de cálculo.

	Método de cálculo pela análise de dez replicados independentes	Método de cálculo através dos parâmetros associados à recta de regressão
Limite de Detecção	21 mg.kg^{-1}	14 mg.kg^{-1}
Limite de Quantificação	24 mg.kg^{-1}	42 mg.kg^{-1}

Analisando os resultados obtidos para cada um dos métodos de cálculo dos limiares analíticos verifica-se uma grande discrepância entre eles. Enquanto para o cálculo efectuado com os dez replicados de um branco fortificado, os limites de detecção e de quantificação possuem valores próximos, no caso do cálculo pelos parâmetros associados à regressão, os valores obtidos para os limiares distam bastante um do outro. Seria espectável e favorável obter um valor de limite de quantificação o mais próximo possível do limite de detecção, o que não acontece num dos métodos de cálculo. Uma possível justificação para estes resultados deve-se ao facto de o cálculo recorrendo à recta de calibração introduzir mais erros no mesmo, visto que se trata de uma manipulação experimental, à qual se sucedem várias manipulações matemáticas que vão introduzindo erros sucessivos nos resultados. Para além disto, o resultado dos limites de detecção e de quantificação obtidos pela recta de regressão deveria ser confirmado pelo estudo da estabilidade da mesma, que não foi efectuado neste trabalho. O *Guia para Acreditação de*

Laboratórios Químicos (IPAC, 2005) apresenta também algumas justificações para o aparecimento de valores irrealistas para os limiares analíticos, quando determinados recorrendo à estatística dos mínimos quadrados da recta de regressão, sendo as justificações apontadas, a possibilidade de não existência de homogeneidade de variâncias, falha da linearidade até à origem ou exclusão do branco da recta de calibração. Assim, será mais confiável, a utilização dos valores de limiares analíticos obtidos pelo método da análise de dez brancos fortificados independentes, que é de facto o modo mais comum de avaliar estes dois parâmetros de validação, especialmente porque a parte estatística deve funcionar apenas como uma orientação, visto que os limiares para um procedimento analítico podem variar em função do tipo de amostra e para tal não existe uma fórmula estatística.

Assim, a mais pequena concentração de óleo mineral que pode ser detectada numa amostra, para este método especificamente é de 21 mg.kg^{-1} , mas a quantificação da concentração deste composto nessa amostra, com um valor exacto, só poderá ser efectuada a partir de 24 mg.kg^{-1} . Para além disto, uma leitura inferior a 21 mg.kg^{-1} não significa obviamente, a ausência de óleo mineral na amostra, apenas podendo afirmar-se que - com uma probabilidade de 97,5 % - a concentração deste na amostra será inferior aos 21 mg.kg^{-1} determinados como limite de detecção. Relativamente ao limite de quantificação, deveria ter sido efectuada uma confirmação da exactidão e precisão conseguida com este valor, com a finalidade de verificar se é satisfatória, compreendendo esta análise, a realização de ensaios, em condições de precisão intermédia, numa série de padrões internos com concentração igual ou próxima do limiar de quantificação, tendo em conta que o coeficiente de variação (razão entre o desvio padrão e a média dos valores observados) para estes padrões não deve exceder os 10 %.

Na literatura consultada (Biedermann *et al*, 2009; Bulder *et al*, 2008; Concini *et al*, 2008; Fiorini *et al*, 2008; Fiorini *et al*, 2010; Karasek *et al*, 2010; Neukom *et al*, 2002; Tennant, 2004) não há referência a limiares analíticos obtidos noutros estudos utilizando o mesmo método que foi empregue na elaboração deste trabalho, no entanto, existem referências a limiares analíticos para um método que utiliza *GC-FID* com injeção *splitless* (Fiorini *et al*, 2010), com um limite de detecção de 5 mg.kg^{-1} e um limite de quantificação de 15 mg.kg^{-1} e para um outro método que acopla *LC-SE-LC-GC-FID* (Moret *et al*, 1997), com um limite de detecção de 1 mg.kg^{-1} . O que se verifica é que o método mais sofisticado em termos de equipamentos e metodologia utilizada é aquele que possui maior sensibilidade – detectando e quantificando menores quantidades de analito – verificando-se também que a injeção *splitless*, em vez da injeção *on column*, permite também um aumento da sensibilidade do método, no entanto, nunca alcançando os valores obtidos com um método que acopla várias

técnicas, que permite uma melhor separação dos compostos de interesse e portanto a detecção de menores quantidades de analito. Ainda assim, apesar de o método utilizado neste trabalho ser aquele que possui menor sensibilidade – permite detectar e quantificar a concentrações mais elevadas – o que se verifica é que os limiares analíticos obtidos são satisfatórios para o tipo de análise que se pretende, que é a verificação da conformidade do óleo em questão com os limites legais impostos em termos de óleo mineral, uma vez que, permite detectar e quantificar o analito abaixo dos 50 mg.kg^{-1} .

Convém ainda salientar que a estimativa quer do limite de detecção, quer do limite de quantificação não foi executada recorrendo a brancos, visto que o branco associado a este método, não possui sinal em termos de óleo mineral. Assim, tendo em conta que este não possui sinal, seria impossível usar esses dados para efectuar os cálculos mencionados acima. A fortificação efectuada é a mais baixa concentração de parafina líquida que o método permite analisar tendo em conta as condições no laboratório - equipamento usado e software de integração disponível. Foram ainda testadas outras concentrações para a execução da fortificação do branco, mas no caso da concentração de $7,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ não foi detectado sinal em termos de óleo mineral e para a concentração de $11,25 \text{ mg.kg}^{-1}$ o sinal gerado é de tal forma pequeno, que a integração se torna extremamente difícil, pelo que, se utilizou uma concentração de 15 mg.kg^{-1} para a contaminação do branco usado nesta análise.

A actualização dos valores dos limiares analíticos deverá ser efectuada sempre que ocorram alterações de factores de influência, tal como, o analista, os reagentes, o equipamento, entre outros ou sempre que se faça uma nova recta de calibração e se utilize os parâmetros relativos à mesma para o cálculo dos limiares, sendo que, mais uma vez se poderá efectuar um estudo de estabilidade e adoptar como limiares analíticos a média aritmética dos limites de detecção e quantificação relativos a uma série significativa de rectas de calibração.

IV.3. Precisão

A avaliação da precisão tem como intuito averiguar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, executados sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, em condições definidas, consoante a forma de expressar tal avaliação:

- **Repetibilidade** que exprime a precisão de um método efectuado em condições idênticas, ou seja, em que os ensaios são efectuados sobre a mesma amostra em

condições tão estáveis quanto possível - mesmo laboratório, equipamento, analista, reagentes e em curtos intervalos de tempo;

- **Reprodutibilidade** que se refere à precisão de um método executado em diferentes condições de ensaio, isto é, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre a mesma amostra, mas fazendo variar as condições de medição, tais como, diferentes laboratórios, diferentes analistas, diferentes equipamentos e/ou diferentes tempos;
- **Precisão Intermédia** ou variabilidade intralaboratorial que é um processo de avaliação da precisão intermédio entre a repetibilidade e a reprodutibilidade, isto é, um estudo que se realiza sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exactamente quais as condições a variar.

IV.3.1. Repetibilidade

Na avaliação da precisão do método através da repetibilidade foram analisados dez replicados de uma amostra de óleo de girassol refinado (Quadro XI; Anexo C). Os cálculos necessários à determinação deste parâmetro serão efectuados quer recorrendo à recta de calibração, quer através da expressão geral que o próprio método apresenta, possibilitando a comparação dos dois modos de cálculo.

Quadro XI: Resultados obtidos (em mg.kg^{-1}) na determinação da repetibilidade.

Ensaio	Resultado obtido através da expressão do método (mg.kg^{-1})	Resultado calculado a partir da recta de calibração (mg.kg^{-1})
1	102,383	68,061
2	102,969	68,434
3	102,582	68,197
4	103,980	69,076
5	106,087	70,412
6	104,598	69,462
7	106,103	70,464
8	107,561	71,408
9	107,268	71,212
10	103,796	68,976
Média	104,733	69,570
Desvio Padrão	1,911	1,231

O que se verifica pela informação veiculada no Quadro XI, é que os resultados obtidos para a mesma amostra, mas usando dois métodos de cálculo distintos são diferentes. O método de cálculo recorrendo à recta de calibração conduz a resultados substancialmente mais baixos do que os obtidos aquando da utilização da expressão mencionada no método. Um factor a ter em conta é o facto de os resultados obtidos, através da recta de calibração, resultarem de extrapolação, uma vez que, os valores obtidos experimentalmente de área normalizada se encontram fora da gama analisada para a construção da recta de calibração. Deste modo, dever-se-ia ter procedido à diluição da amostra e posterior análise. No entanto, visto que, esta amostra foi também analisada num ensaio interlaboratorial, é possível constatar que o método de cálculo recorrendo à expressão mencionada no método é o que proporciona valores de maior concordância com este ensaio (Capítulo IV.4.2.).

Nota: Dado que os resultados calculados com base na recta de calibração são incoerentes - de acordo com o referido acima - não será utilizado a partir deste momento, o modo de cálculo de concentração final a partir da recta de calibração, devendo-se posteriormente proceder à confirmação experimental dos resultados obtidos para a construção da mesma.

Apesar da constatação mencionada anteriormente, os cálculos que se efectuarão de seguida contemplarão os dois modos de cálculo, por uma questão de comparação dos mesmos.

A partir do desvio padrão dos resultados dos ensaios efectuados sob condições de repetibilidade pode-se calcular o limite de repetibilidade (r), que capacita o analista para decidir se a diferença entre análises efectuadas em condições de repetibilidade é significativa (Relacre, 2000):

$$r = t_{(n-1,1-\alpha)} \cdot \sqrt{2} \cdot s$$

onde:

- s é o desvio padrão amostral associado aos resultados considerados para cada nível de concentração;
- $t_{(n-1,1-\alpha)}$ para um nível de confiança de 97,5 % e 10 observações toma o valor de 2,26.

Assim, para os resultados calculados com base na recta de calibração o limite de repetibilidade é de 3,93 mg.kg⁻¹ e para os resultados obtidos pela expressão veiculada no método, este parâmetro é de 6,11 mg.kg⁻¹. Isto é, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, para a determinação de óleo mineral por este método cromatográfico e obtidos

em condições de repetibilidade, não deve exceder os valores de 3,93 mg.kg⁻¹ e 6,11 mg.kg⁻¹ dependendo do método usado para efectuar o cálculo da concentração de óleo mineral na amostra. Esta diferença entre o limite de repetibilidade associado a cada um dos métodos de cálculo da concentração é justificada pelo valor do desvio padrão dos resultados, que é maior no caso do cálculo efectuado recorrendo à expressão mencionada no método, tendo em conta que, o limite de repetibilidade é proporcional ao desvio padrão associado ao estudo efectuado em condições de repetibilidade.

Uma outra forma de expressar a precisão baseada em dados de repetibilidade é através do coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) expresso em termos de percentagem (Relacre, 2000):

$$CV_r = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

onde:

- s é o desvio padrão de repetibilidade;
- \bar{x} é a média dos valores observados no ensaio de repetibilidade.

Então, o coeficiente de variação de repetibilidade para o método de cálculo usando a recta de calibração é de 1,77 % e usando a expressão do método é de 1,82 %. Estes dados corroboram os obtidos para o limite de repetibilidade, uma vez que, para o coeficiente de variação de repetibilidade também o modo de cálculo pela expressão baseada no método possui uma maior percentagem do que para o método de cálculo recorrendo à recta.

Na prática aceitam-se resultados de duas determinações efectuadas em condições de repetibilidade se o módulo da diferença entre esses dois resultados não exceder o limite de repetibilidade, que neste caso assumirá o valor de 6,11 mg.kg⁻¹ - limite de repetibilidade associado ao modo de cálculo da concentração de óleo mineral através da expressão mencionada no método - pelo facto de existir um ensaio interlaboratorial que favorece este método de cálculo, em detrimento da recta de calibração. Caso a amplitude de dois ensaios seja superior ao limite, dever-se-á numa primeira fase, fazer uma análise crítica e, caso seja necessário, recorrer à repetição de ensaios segundo um plano assente em dados bibliográficos ou normas.

Para validação mais pormenorizada deste parâmetro - repetibilidade - poder-se-ia ter recorrido à análise de uma outra amostra, também em condições de repetibilidade, mas com

um teor mais reduzido em óleo mineral, ou seja, efectuar a determinação da repetibilidade em dois níveis de concentração de óleo mineral distintos. Tal não foi possível por falta de uma amostra deste tipo.

IV.3.2. Reprodutibilidade

A análise da precisão através da reprodutibilidade não foi efectuada neste trabalho, uma vez que, apesar de ter sido realizado um ensaio interlaboratorial (Capítulo IV.4.2.), este não foi efectuado a nível oficial, tratando-se de uma análise comumente pedida a outros laboratórios. Os resultados facultados mencionam apenas o valor correspondente ao teor de óleo mineral da amostra, não facultando dados relativos ao número de replicados efectuados para obter tal resultado, o método utilizado por cada laboratório ou mesmo o desvio padrão associado ao resultado fornecido. Assim, estes dados não permitem a determinação deste parâmetro de validação, servindo apenas como uma referência em termos de concentração de óleo mineral na amostra analisada por laboratórios, em que a implementação deste método já foi efectuada.

Caso este parâmetro tivesse sido determinado seria possível, tal como para a repetibilidade, encontrar um limite de reprodutibilidade para validar ensaios desta natureza. No entanto, este cálculo implica o conhecimento do desvio padrão associado aos resultados de cada laboratório, dados que não foram facultados, como já foi referido.

Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação do método executado por um único laboratório, é um parâmetro de validação importante quando o laboratório procura a verificação do desempenho do seu método em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparações interlaboratoriais.

As duas medidas de dispersão referidas – repetibilidade e reprodutibilidade – representam os extremos de variabilidade de um método de ensaio, sendo a repetibilidade uma medida da variabilidade mínima e a reprodutibilidade, uma medida da variabilidade máxima dos resultados. Assim, e visto que, foi determinada a repetibilidade deste método, há que cumprir estes critérios de variabilidade mínima, uma vez que, não foi possível a análise e determinação dos critérios de variabilidade máxima.

IV.3.3. Precisão intermédia

A avaliação da precisão intermédia de um método implica um estudo sobre uma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exactamente quais as condições a usar, de entre diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes épocas, com ou sem verificação da calibração. Dado não ser possível a realização deste ensaio noutra laboratório, nem a utilização de outro equipamento ou outro analista, resta efectuar esta análise em tempos diferentes, ou seja, em dias distintos.

Este estudo compreendeu, assim, a análise de um branco fortificado com 15 mg.kg^{-1} de parafina líquida, em dias de análise diferentes (Quadro XII), mas utilizando os mesmos reagentes, equipamento e analista. Devido à complexidade e necessidade de recursos, a verificação da calibração não foi efectuada neste estudo específico.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e como tal, a mais aconselhável de usar.

Quadro XII: Resultados obtidos nos dez ensaios para a avaliação da precisão intermédia.

Ensaio	Resultado (mg.kg^{-1})
1	19,580
2	18,529
3	19,085
4	18,549
5	19,711
6	19,408
7	19,486
8	18,923
9	18,376
10	19,233
Média	19,088
Desvio padrão	0,477

No estudo da precisão intermédia efectuado neste trabalho foi usado um método simplificado para estimar este parâmetro, efectuando n medições sobre um padrão de concentração 15 mg.kg^{-1} variando apenas o dia em que a medição é efectuada.

Neste caso, o cálculo da precisão intermédia baseia-se na expressão (Relacre, 2000):

$$Si_{(T)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

onde:

- $Si_{(T)}$ é o desvio padrão de precisão intermédia relativo às condições de precisão intermédia que aparecem entre parêntesis, ou seja, fazendo variar o tempo de análise;
- n é o número de repetições;
- y_k é o resultado individual obtido;
- \bar{y} é a média aritmética dos resultados individuais obtidos.

Assim, o desvio padrão de precisão intermédia baseado no estudo de dez análises independentes da mesma amostra, em dias distintos, é de 0,48 mg.kg⁻¹ - sendo este considerado o valor de variabilidade dos resultados usando este método especificamente.

Uma crítica necessária a esta determinação é o facto ser necessário a realização do maior número de repetições técnica e economicamente viáveis, sendo recomendado para o cálculo da precisão intermédia, um mínimo de quinze repetições, o que não foi atingido na análise efectuada neste trabalho.

Ainda a salientar, dentro da determinação da precisão do método, que este estudo poderia contemplar a comparação da precisão entre métodos, que consiste no confronto dos resultados obtidos pelo método a ser validado com os resultados obtidos recorrendo a um método de referência. Este estudo visa a comparação da precisão de um método em processo de implementação com uma referência. No caso específico da determinação de óleo mineral, existe uma Norma ISO - que ainda se encontra em processo de estudo para posterior aceitação, podendo ainda sofrer algumas alterações no seu conteúdo - que poderia ser usada para efectuar esta comparação. No entanto, esta avaliação implica a realização de análises em replicado, utilizando os dois métodos em separado, sobre as mesmas amostras, em toda a gama de concentrações em que se pretende validar o método, o que se torna economicamente pouco viável. Assim, este estudo comparativo não foi efectuada para a validação do método em implementação.

IV.4. Exactidão

O estudo da exactidão de um método visa avaliar a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro e implica uma combinação de erros aleatórios e sistemáticos.

Os processos normalmente usados para a avaliação da exactidão de um método compreendem entre outros (Relacre, 2000) o uso de materiais de referência, a participação em comparações interlaboratoriais e a realização de ensaios de recuperação.

IV.4.1. Materiais de Referência Certificados (MRC)

Relativamente aos Materiais de Referência Certificados (MRC), foram consultadas as duas bases de dados mais importantes, de entidades que comercializam MRC, IRMM – *Institute for Reference Materials and Measurements* e NIST – *National Institute of Standards and Technology*, tendo-se verificado que não existem materiais de referência certificados para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados com origem mineral.

IV.4.2. Comparações interlaboratoriais

Em relação a comparações interlaboratoriais, como já foi referido anteriormente, procedeu-se ao envio de uma amostra de óleo de girassol refinado (Anexo D – Figura D1) para quatro laboratórios, que efectuaram a análise para determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados de origem mineral, de acordo com os métodos que possuem implementados, mas que não foram mencionados nos resultados facultados. Para além desta amostra foi ainda enviada uma outra de óleo de soja bruto para dois dos laboratórios - não foi enviada para os outros dois, por uma questão de falta de disponibilidade dos mesmos para a realização destas análises. Os resultados obtidos, incluindo os do Laboratório de Estudos Técnicos, encontram-se sumarizados no Quadro XIII.

Quadro XIII: Resultados obtidos (mg.kg^{-1}) nos ensaios interlaboratoriais, para as amostras de óleo de girassol refinado e óleo de soja bruto.

Amostra Laboratório¹	Óleo de Girassol Refinado (mg.kg^{-1})	Óleo de Soja Bruto (mg.kg^{-1})
LET	105	224
Laboratório B	105	140
Laboratório C	98	299
Laboratório D	108	-
Laboratório E	73	-
Média	98	221
Desvio Padrão	14	80

O ensaio efectuado é do tipo de aptidão, em que, o objectivo é avaliar o desempenho dos laboratórios participantes, mais especificamente, avaliar a exactidão dos resultados obtidos neste trabalho experimental.

A avaliação de desempenho de um laboratório que participa num ensaio deste tipo é feita com base no Z-score (Relacre, 2000):

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s}$$

onde:

- X_{lab} é o valor obtido pelo laboratório;
- X_v é o valor aceite como verdadeiro, isto é, a média dos valores obtidos no ensaio interlaboratorial;
- s é a unidade de desvio, que pode ser o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial, a incerteza de X_v ou outro desvio que assente em critérios de exigência por parte de quem organiza tal ensaio.

Dado que os participantes neste circuito interlaboratorial não facultaram informação acerca do desvio padrão associado aos resultados obtidos, para o cálculo do Z-score será considerado o desvio padrão da média das observações dos vários laboratórios.

¹ Ao longo deste trabalho não serão referidos nomes de laboratórios que contribuíram para o estudo, nos ensaios interlaboratoriais, por questões de confidencialidade.

Assim, o *Z-score* obtido neste estudo, para o Laboratório de Azeites, relativamente à amostra de óleo de girassol é de 0,5 e em relação à amostra de óleo de soja bruto é de aproximadamente 0,04.

A escala de valores que permite a avaliação do *Z-score* obtido é a seguinte (Relacre, 2000):

- $|Z| \leq 2$: Satisfatório;
- $2 < |Z| \leq 3$: Questionável;
- $|Z| > 3$: Incorrecto.

Tendo em conta a escala mencionada, pode-se constatar que os valores de *Z-score* obtidos para ambas as amostras se encontram no patamar satisfatório, pelo que, se pode comprovar que a exactidão do método usado é também satisfatória.

Um outro parâmetro importante na verificação da exactidão do método é o erro normalizado, em que, caso o laboratório calcule a incerteza do seu resultado (U_{lab}), o valor aceite como verdadeiro no ensaio (X_v) deve estar contido no intervalo de incerteza do valor obtido pelo laboratório (X_{lab}). Quando tal não acontece, o intervalo pode estar subestimado, devendo, ser empregue o conceito de erro normalizado (E_n) para efectuar a avaliação do desempenho (Relacre, 2000):

$$E_n = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}$$

onde:

- U_{ref} é a incerteza associada ao valor aceite como verdadeiro.

Se $|E_n| \leq 1$, então U_{lab} está bem estimada.

Os resultados obtidos e a respectiva incerteza, calculada com base na incerteza padrão - que corresponde ao desvio padrão associado à média dos valores obtidos experimentalmente nos diversos ensaios - apresentam-se no Quadro XIV. O fornecimento do valor de concentração de óleo mineral presente na amostra, associado a uma incerteza é importante neste tipo de avaliação, pois permite determinar se os valores apesar de discrepantes numa visão mais grosseira, podem ser considerados semelhantes, por exemplo, devido a elevadas incertezas.

Quadro XIV: Resultados obtidos (mg.kg^{-1}), pelo LET, na análise de amostras de óleo de girassol refinado e óleo de soja bruto, englobadas no ensaio interlaboratorial.

Amostra	Número de replicados	Média (mg.kg^{-1})	Desvio padrão (mg.kg^{-1})
Óleo de Girassol Refinado	10	104,7	1,9
Óleo de Soja Bruto	2	223,5	13,4

Antes de avançar na avaliação do desempenho, convém assinalar que o número de replicados em cada amostra não é o mesmo, uma vez que, a amostra de óleo de girassol foi também analisada para o estudo da repetibilidade, tendo esses resultados sido considerados nesta análise, enquanto a amostra de óleo de soja bruto possui um número de replicados de acordo com o que será rotina no laboratório, uma vez que, foi analisada exclusivamente para este parâmetro.

Fazendo uso do conceito de erro normalizado e comparando os valores obtido no Laboratório de Estudos Técnicos ($105 \pm 2 \text{ mg.kg}^{-1}$ para a amostra de óleo de girassol refinado e $224 \pm 13 \text{ mg.kg}^{-1}$ para a amostra de óleo de soja bruto) com os valores de referência obtidos nas comparações interlaboratoriais ($98 \pm 14 \text{ mg.kg}^{-1}$ para a amostra de óleo de girassol refinado e $221 \pm 80 \text{ mg.kg}^{-1}$ para a amostra de óleo de soja bruto) verifica-se que o valor aceite como verdadeiro (obtido no ensaio interlaboratorial) não se situa dentro do intervalo de incerteza do valor obtido no laboratório para o caso da amostra de girassol, mas encontra-se nesse intervalo para o caso do óleo de soja. Assim, utilizando a expressão do erro normalizado para a amostra de óleo de girassol refinado, obtém-se um valor de 0,5, ou seja, menor do que 1, pelo que se pode concluir que a incerteza associada ao valor obtido no laboratório está bem estimada.

Analizando quer os dados do Quadro XIII, quer do Quadro XIV, o que se verifica é uma dispersão relativamente grande dos resultados obtidos. Relativamente à amostra de óleo de girassol, o que se verifica é o aparecimento de um resultado (Laboratório E) completamente discordante dos restantes. Esta discordância pode ser justificada pelo modo de integração do cromatograma obtido, uma vez que, experimentalmente se verificou que a etapa de integração manual é a que introduz maiores erros no resultado final (este assunto será abordado de forma mais alongada no subcapítulo correspondente à robustez do método). No entanto, para poder comentar mais correctamente estes valores seria necessário o acesso à incerteza padrão associada aos mesmos, o que não foi facultado pelos vários laboratórios. Tendo como referência o valor obtido na análise efectuada no Laboratório de

Estudos Técnicos ($105 \pm 2 \text{ mg.kg}^{-1}$ para o óleo de girassol e $224 \pm 13 \text{ mg.kg}^{-1}$ para o óleo de soja), o que se verifica é que para a amostra de óleo de girassol apenas o Laboratório B possui um valor concordante, no entanto, tanto o Laboratório C, como o Laboratório D podem também ser concordantes com este valor, dependendo da incerteza associada. Relativamente ao óleo de soja, para além de existirem poucos resultados, é muito difícil efectuar comparações sem o respectivo valor da incerteza, uma vez que, quanto maior a concentração de óleo mineral observada, maior vai ser a incerteza associada, especialmente tendo em conta que este método é concebido para avaliar concentrações relativamente baixas, dado que, o limite legal são 50 mg.kg^{-1} .

IV.4.3. Ensaios de Recuperação

Ainda focando a atenção na exactidão do método, foram efectuados ensaios de recuperação contemplando os vários tipos de óleo - quer de girassol (Anexo D – Figuras D2 e D3), quer de soja (Anexo D – Figuras D4 e D5), brutos e refinados - numa tentativa de abranger o máximo de tipos possíveis de amostras que poderão ser futuramente analisadas. Os ensaios de recuperação basearam-se na análise da amostra ao natural - que é designada controlo - e posterior análise da mesma após fortificação com 50 mg.kg^{-1} de parafina líquida. A escolha da fortificação com 50 mg.kg^{-1} de parafina deve-se ao facto de este ser o limite máximo de óleo mineral permitido em óleo de girassol. No entanto, para um estudo mais pormenorizado deveriam ter sido analisadas amostras em que a fortificação deveria contemplar os limites mínimo e máximo da gama de trabalho escolhida. Os resultados dos ensaios de recuperação encontram-se resumidos no Quadro XV.

Na análise da exactidão através de ensaios de recuperação, a taxa de recuperação é calculada segundo a expressão (Relacre, 2000):

$$\text{Taxa de Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

onde:

- C_1 é a concentração do analito na amostra fortificada;
- C_2 é a concentração do analito na amostra não fortificada;
- C_3 é a concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

Quadro XV: Resultados obtidos nos ensaios de recuperação, para o estudo da exactidão do método.

Tipo de Óleo		Resultado (mg.kg ⁻¹)	Taxa de Recuperação
Óleo de Girassol Bruto	Controlo	21,564	99 %
	Fortificação	70,919	
Óleo de Girassol Refinado	Controlo	18,118	93 %
	Fortificação	64,573	
Óleo de Soja Bruto	Controlo	121,799	105 %
	Fortificação	174,207	
Óleo de Soja Refinado	Controlo	24,419	94 %
	Fortificação	71,545	

Os critérios de aceitação das taxas de recuperação, para este método e especificamente para o Laboratório de Estudos Técnicos, foram definidos internamente como sendo uma variação de 10% em relação à recuperação ideal, os 100 %. Assim, as taxas de recuperação serão aceites como satisfatórias num intervalo de 90 % a 110 %. Observando os valores obtidos para a taxa de recuperação em amostras de óleo de girassol bruto e refinado e em outras de óleo de soja bruto e refinado verifica-se que estas se encontram dentro dos critérios estabelecidos. Confirma-se, assim, que a exactidão do método é satisfatória, tal como já havia sido referido aquando da análise dos resultados dos ensaios interlaboratoriais.

Há ainda que referir que este procedimento possui como limitação o facto de a parafina líquida adicionada não estar necessariamente na mesma forma que o óleo mineral se apresentaria, numa amostra real sem contaminação propositada. Este factor é importante porque a presença de analitos mais facilmente detectáveis pode ocasionar avaliações excessivamente optimistas da recuperação.

IV.5. Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações, sendo um método considerado robusto se se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer aquando da sua execução.

A análise da robustez do método foi efectuada de um modo intuitivo e pouco estruturado, não utilizando um modo comum de análise deste parâmetro de validação que é o teste de *Youden*, visto que, para que este seja correctamente elaborado é necessário efectuar uma grande quantidade de análises, o que requereria muito tempo e é economicamente pouco

viável. Os aspectos que serão seguidamente abordados com o intuito de averiguar a robustez resultam de situações inesperadas que foram surgindo ao longo do trabalho prático ou de experiências efectuadas para resolver alguns problemas que foram aparecendo.

Este trabalho prático foi inicialmente efectuado utilizando *n*-hexano de pureza analítica (com 99,0 % de pureza), tendo-se verificado que efectuando um branco com este reagente apareceria uma banda larga - típica de óleo mineral - no cromatograma obtido (Anexo E – Figura E1). Para comparação foi efectuada a mesma análise do branco, mas utilizando como eluente da cromatografia líquida *n*-hexano para cromatografia (também com 99,0 % de pureza) e verificou-se a inexistência de qualquer banda, sendo este cromatograma composto apenas pelo pico correspondente ao padrão interno (Anexo E – Figura E2). Este estudo de comparação foi ainda efectuado para uma amostra de óleo de girassol refinado, sem contaminação de óleo mineral, que mais uma vez confirmou os resultados obtidos da análise do branco - com o aparecimento de uma banda típica de óleo mineral aquando da análise com *n*-hexano de pureza analítica e o desaparecimento dessa banda na análise com *n*-hexano próprio para cromatografia. Isto significa que apesar do grau de pureza do reagente ser o mesmo, o *n*-hexano específico para cromatografia possui menor quantidade de contaminantes do que o *n*-hexano de pureza analítica, o que se justifica através do facto de os solventes para cromatografia necessitarem de ser mais puros do que os restantes, uma vez que, entram em contacto com a coluna cromatográfica, que pode ligar compostos à sua estrutura química e caso o solvente seja impuro pode levar a contaminações da coluna que a danifiquem irreversivelmente, pelo que é imprescindível que possuam um grau de pureza elevado e poucos contaminantes na sua composição. Neste caso, apesar do *n*-hexano não entrar em contacto com a coluna cromatográfica em GC, pode e de facto introduz uma contaminação de óleo mineral na amostra, quando não é de grau próprio para utilização cromatográfica.

Para além disto, ainda relativamente aos reagentes usados nesta determinação, o gel de sílica após ser prateado, com recurso a uma solução de nitrato de prata, necessita de ser correctamente armazenado, num frasco de vidro opaco, envolto em papel de prata e colocado num local escuro, sem humidade. Caso o armazenamento da mesma não seja o correcto verifica-se que passados dois dias da preparação, a sílica se encontra imprópria para utilização, originando um pico cromatográfico grande, junto ao padrão interno, que no método é apresentado como *kaureno*. Segundo o método usado neste trabalho, este pico pode ainda aparecer derivado de um gotejamento rápido de mais ou pouca compactação da sílica na cromatografia em coluna.

No método usado como base para este trabalho prático não é mencionada a necessidade de filtração da amostra, quando esta possui impurezas em suspensão, no entanto, na Norma ISO relativa à determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados de origem mineral em óleos vegetais, é mencionada a necessidade de filtração de amostras com esta característica. Para avaliar estes dados foi utilizada uma amostra de óleo de girassol bruto com impurezas suspensas, usando o método em estudo com e sem filtração da amostra (Anexo E – Figura E3). Os ensaios para cada uma das situações experimentais foram efectuados em triplicado e os resultados obtidos encontram-se sumarizados no Quadro XVI.

Quadro XVI: Resultados dos ensaios para testar a necessidade de filtração de amostras com impurezas.

Condições	Média ± Desvio Padrão (mg.kg ⁻¹)	
Sem filtração	23,826	24,2 ± 1,1
	23,262	
	25,419	
Com filtração	23,673	23,4 ± 0,3
	23,077	
	23,412	

O que se verifica neste estudo é que a filtração não altera o valor da concentração de óleo mineral obtido e pelo facto de ser uma operação que demora algum tempo, poder-se-á prescindir deste passo. No entanto, seria aconselhável efectuar este estudo noutras amostras, possivelmente noutras gamas de concentração, uma vez que, a amostra analisada possui uma concentração baixa tendo em conta a gama analisada neste trabalho e uma concentração alta pode levar a conclusões diferentes. Este estudo mais aprofundado não foi efectuado porque durante o trabalho prático, a amostra analisada foi a única que apresentou impurezas em suspensão.

Ainda referente à manipulação do método foi analisada uma amostra de óleo de soja bruto, cuja contaminação é de hidrocarbonetos alifáticos saturados de origem mineral, de cadeia curta. Tal não é de estranhar visto se tratar de um óleo bruto, que, portanto, ainda não foi sujeito a refinação, uma vez que, num passo de refinação a contaminação com cadeias mais curtas deveria desaparecer, tendo em conta que, a desodorização permite a remoção de massas moleculares abaixo dos C₂₀ (Grundböck *et al*, 2010). A análise desta amostra foi efectuada em quadruplicado tendo-se verificado na primeira análise que a banda larga correspondente a óleo mineral tinha início logo no começo do cromatograma (Anexo E – Figura E4). Aquando das restantes análises verificou-se o desaparecimento de um pouco do

início desta banda, iniciando-se esta mais à frente no cromatograma (Anexo E – Figura E5). Este trata-se de um aspecto importante, visto que, uma explicação para o desaparecimento da zona inicial da banda de óleo mineral é a evaporação das cadeias mais curtas dos hidrocarbonetos contaminantes, aquando da evaporação do solvente no evaporador rotativo, o que poderá levar a leituras enganosas por defeito. Mais uma vez para avaliação mais estruturada, este aspecto deveria ter sido estudado noutras amostras (durante a elaboração experimental deste trabalho não existiram mais amostras com tal característica, uma vez que, é mais comum o aparecimento de amostras com contaminações de hidrocarbonetos alifáticos saturados de origem mineral de cadeias mais longas).

Devido a um aspecto inesperado durante o trabalho experimental - a avaria irreparável do computador de suporte ao software de integração - houve necessidade de alteração do software usado para integração dos cromatogramas obtidos, permitindo assim, efectuar algumas comparações em termos do modo de integração, que é o ponto mais fraco e que permite maior introdução de erros nos resultados obtidos ao nível deste método. Inicialmente era usado o software de integração *Turbochrom Navigator*, que é um tipo de software mais permissivo que o actual software utilizado - *Clarity*. O primeiro permitia efectuar qualquer tipo de integração manual, sem restrições e possuía algumas funções de correcção de picos, que por exemplo, permitiam corrigir picos com arrastamento, eliminando a parte correspondente ao arrastamento, ou seja, desenhando um pico perfeito - pico alongado, que se inicia e termina na linha de base, sem arrastamento. O actual software é mais autónomo, com funções de integração pré-definidas e determinadas situações de integração não são permitidas pelo mesmo, como é o exemplo da correcção do arrastamento de um pico, uma vez que, este software não permite a obtenção de um pico perfeito a partir de um com arrastamento. Dado que a forma de integrar um cromatograma se altera consoante o software utilizado, o que se pode verificar é o aparecimento de resultados diferentes consoante o tipo de integração. Com o antigo software haviam já sido analisados alguns dos dez replicados relativos ao estudo dos limiares analíticos (Anexo E – Figura E6), que por uma questão de coerência foram novamente analisados no novo software (Anexo B), permitindo assim a comparação dos resultados obtidos com cada modo de integração (Quadro XVII).

Analisando os dados destas duas formas de integração, o que se observa é que os valores não são significativamente diferentes, visto que a integração recorrendo ao software *Turbochrom Navigator* fornece um resultado de $20,9 \pm 0,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ e recorrendo ao software *Clarity* o valor obtido é de $19,1 \pm 0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ na análise de um branco fortificado com 15 mg.kg^{-1} de parafina líquida. No entanto, o software *Turbochrom Navigator* fornece sempre

valores de concentração superior aos obtidos com o software *Clarity*, sendo esta pequena diferença justificada pela forma diferenciada de integração de cada um dos softwares, para além do facto de este método ser extremamente sensível à forma de integração do cromatograma obtido.

Quadro XVII: Comparação de sistemas de integração através da inspecção de resultados obtidos para a análise dos limiares analíticos.

	Software de Integração <i>Turbochrom Navigator</i>	Software de Integração <i>Clarity</i>
Ensaio 1	21,003	19,580
Ensaio 2	20,324	18,529
Ensaio 3	21,682	19,085
Ensaio 4	20,421	18,549
Ensaio 5	22,199	19,711
Ensaio 6	20,064	19,408
Ensaio 7	21,000	19,486
Ensaio 8	20,335	18,923
Ensaio 9	-	18,376
Ensaio 10	-	19,233
Média	20,879	19,088
Desvio Padrão	0,746	0,477

Esta sensibilidade à forma de integração foi experimentada e confirmada através da comparação de vários modos de integração, inclusivamente comparando os resultados obtidos com diversas formas de integração, com laboratórios que já possuem este método correctamente implementado. O que se verifica é que para a obtenção de resultados comparáveis entre os vários laboratórios que efectuem este tipo de análise, é necessário que a integração do cromatograma seja efectuada de forma semelhante, visto que, pequenas variações na forma de integrar alteram completamente o resultado final obtido. Neste trabalho foi adoptada a forma de integração em que apenas interessa, num cromatograma contaminado com óleo mineral, o pico do padrão interno e a banda larga resultante da contaminação. Assim, inicialmente, será integrado o pico do padrão interno - desde o seu início até ao seu final, mesmo que este apresente arrastamento - e depois procura-se a zona em que aparece a banda larga e procede-se à integração da mesma desde o início até ao final dessa banda (Figura 14). Posteriormente procede-se, então, à integração de todos os picos que se encontram sobre a banda larga correspondente a óleo mineral, tendo em atenção que esta integração dos picos de hidrocarbonetos normais num óleo mineral deve ser efectuada vale a vale (Figura 15), com a finalidade de não roubar área

à banda da contaminação. Outra situação importante também neste tipo de análise é o facto de a banda de óleo mineral poder aparecer em zonas distintas do cromatograma, consoante o tipo de contaminação a que o óleo foi sujeito. Se esta contaminação for de cadeias carbonadas mais curtas, o que se verifica é o aparecimento da banda larga logo no início do cromatograma, sendo esta contaminação facilmente eliminada por refinação do respectivo óleo; poderá também aparecer uma banda larga no final do cromatograma correspondente a contaminação com cadeias carbonadas mais longas, sendo esta contaminação mais preocupante do que a anterior, uma vez que, estes compostos não são voláteis e portanto não podem ser eliminados por refinação (mas este é um caso de contaminação menos frequente); e ainda, no caso mais recorrente, aparece uma banda larga no meio do cromatograma, sendo esta derivada de contaminação com cadeias médias, que podem ser parcialmente removidas na refinação, mas que não desaparecem completamente, ou seja, em que a refinação só diminui a concentração dessa contaminação. Situações mais complexas podem ainda levar ao aparecimento de duas bandas distintas, correspondendo ambas a contaminação com óleo mineral, mas de dois tipos distintos.

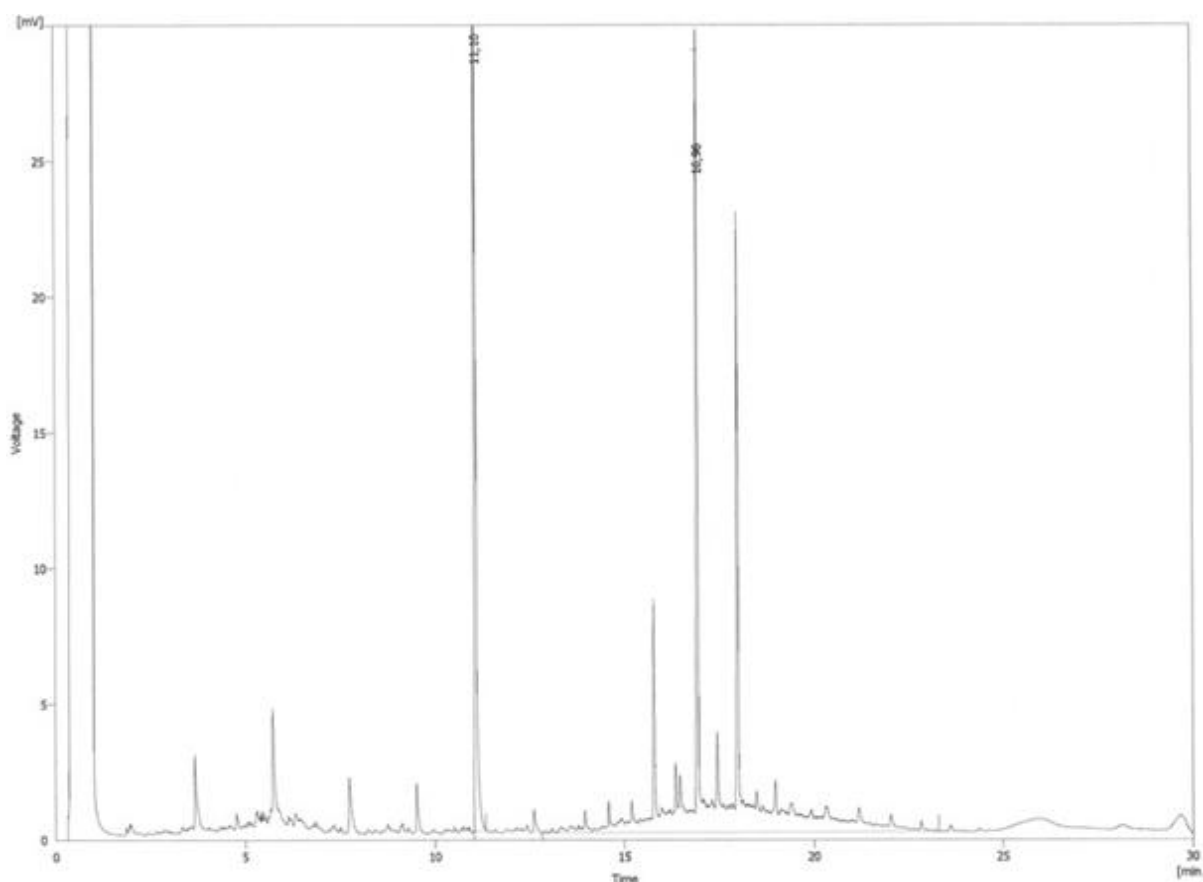


Figura 14: Exemplificação da integração da banda larga correspondente a óleo mineral num cromatograma referente a óleo de girassol refinado.

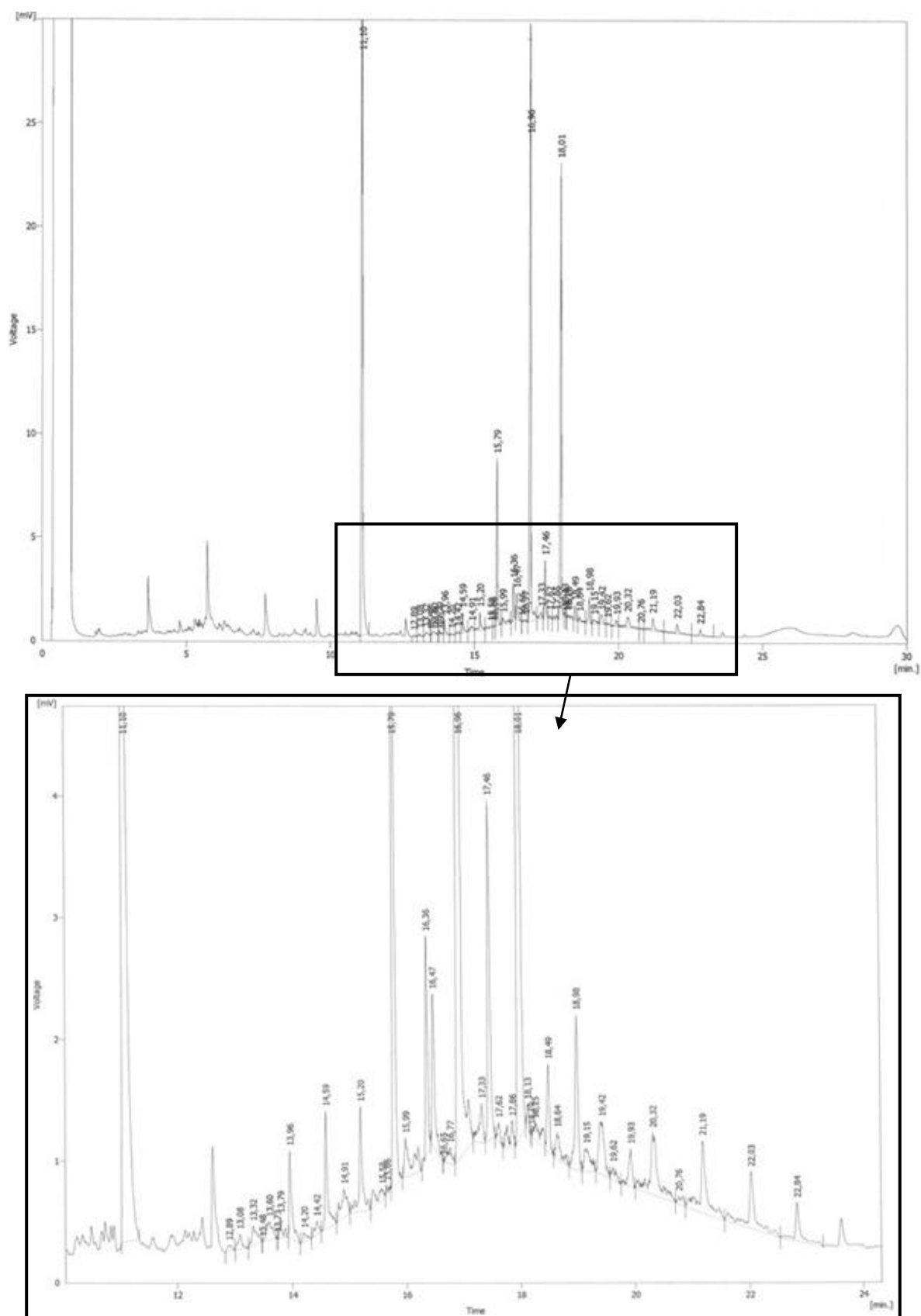


Figura 15: Exemplificação da integração pico a pico dos hidrocarbonetos alifáticos normais num óleo, para o mesmo óleo de girassol refinado apresentado na Figura 13.

Uma crítica a efectuar a este método é o facto de por vezes, o pico do padrão interno aparecer sobre a banda larga correspondente a contaminação com óleo mineral (Anexo E – Figuras E7 e E8), o que numa situação ideal não deveria acontecer, visto que, este actua como uma referência, que não será correctamente contabilizada quando aparece na mesma zona do cromatograma que a contaminação. No entanto, é difícil alterar esta situação, uma vez que, esta banda larga pode aparecer em várias zonas do cromatograma - como foi referido anteriormente - consoante o tipo de contaminação e, portanto, é difícil encontrar um padrão interno que, em nenhuma situação, possa ser detectado na mesma zona da contaminação.

Ainda relativamente ao estudo da robustez do método, foi utilizada a Norma ISO para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados em óleos vegetais - que ainda se encontra em fase de aprovação - para comparação com o método em estudo neste trabalho, dado que, depois de aprovada esta Norma ISO será a referência para o estudo deste tipo de contaminação. Para tal, foram analisadas em triplicado, por cada método em análise, duas amostras distintas, uma de óleo de girassol bruto (Anexo E – Figuras E9 e E10) e outra de óleo de girassol refinado. Foi ainda analisada uma amostra de óleo de soja bruto, mas em duplicado, por cada um dos métodos (Quadro XVIII).

Quadro XVIII: Resultados da comparação entre métodos.

Tipo de Óleo	Método	Média ± Desvio Padrão (mg.kg⁻¹)
Óleo de Girassol Bruto	Método Interno	20,8 ± 0,2
	Método ISO	21,5 ± 0,1
Óleo de Girassol Refinado	Método Interno	114,6 ± 0,7
	Método ISO	116,4 ± 0,5
Óleo de Soja Bruto	Método Interno	223,5 ± 12,8
	Método ISO	198,0 ± 9,2

Através dos dados obtidos neste estudo, o que se verifica é que para as amostras de óleo de girassol - quer bruto, quer refinado - não existem diferenças no valor de concentração obtido, por cada um dos métodos, ou seja, verifica-se que a execução do método ISO ou do método interno conduz a resultados semelhantes. Esta constatação é facilmente compreendida pelo facto de os dois métodos apenas diferirem em pequenos aspectos, tais como a recolha do volume da amostra - que no método interno não se faz, assim como o desprezo do volume correspondente aos dois mililitros de lavagem do copo de pesagem, enquanto no método ISO estes volumes são todos recolhidos para posterior análise em

cromatografia gasosa - e também o volume de eluição - que no método ISO é 70 mL e no método interno é de apenas 55 mL.

Em relação à amostra de óleo de soja bruto verifica-se uma ligeira diferença entre os resultados obtidos para cada um dos métodos, o que é explicado pelo facto de, numa das análises efectuadas com o método interno, aparecer uma banda mais larga do que nas restantes análises. Deveria ter sido averiguada a proveniência de tal contaminação extra, mas por falta de quantidade de amostra para análise, tal não foi possível. Assim, neste caso, deveriam ser efectuados mais estudos noutras amostras de óleo de soja, para confirmação dos resultados obtidos.

Tendo em conta os aspectos observados neste estudo de robustez pode-se concluir que se correctamente executado e atendendo aos pormenores na execução experimental do mesmo (como por exemplo, o correcto armazenamento da sílica prateada), este é um método robusto, cujo ponto fraco é o modo de integração, que deve ser cuidadosamente estabelecido e cumprido, com o objectivo de obter resultados coerentes.

Após o episódio de óleo de girassol contaminado proveniente da Ucrânia foi efectuado um teste de proficiência em 2010 (Karasek *et al*, 2010) com o intuito de verificar a concordância dos resultados obtidos por cinquenta e cinco laboratórios diferentes, usando os métodos que já possuíam implementados, tendo-se verificado a necessidade de standardização dos métodos de análise para a obtenção de resultados concordantes entre si. Este teste corrobora o que foi avaliado neste trabalho na etapa de robustez, em que se verificou que, por exemplo, o modo de integração dos cromatogramas e o software utilizado possuem importância para os resultados obtidos. Esta standardização poderá ser alcançada pela implementação da Norma ISO, pela qual um laboratório se deverá reger para efectuar este tipo de determinação.

Após as várias etapas de validação do método, para além da correcta documentação da validação, devem ser claramente estipulados os procedimentos experimentais a cumprir, para que o método possa ser implementado sem ambiguidades e de acordo com o previsto pelos dados de validação. Caso tal não seja efectuado, o desempenho real do método não corresponderá ao previsto pela validação.

V. Propostas para trabalho futuro

Tendo em conta que a validação é um processo demorado e com muitas etapas a avaliar, não foi possível efectuar todo o trabalho experimental pretendido ao longo do tempo disponível para o mesmo. Assim, existem algumas análises importantes que seriam necessárias efectuar, tendo algumas delas sido referidas ao longo da discussão dos resultados obtidos no processo de validação. Entre estas análises destacam-se:

- ❖ A análise ao longo do tempo da estabilidade da recta de calibração, que dados os resultados obtidos, apesar de mostrar a linearidade do método, fornece resultados não coerentes com o modo alternativo de cálculo dos resultados em termos de concentração;
- ❖ A participação em ensaios interlaboratoriais oficiais, quando estes existirem, com a finalidade de obter a reprodutibilidade do método e confirmar a exactidão do mesmo num circuito oficial;
- ❖ A análise de parâmetros de validação para óleo de soja, tais como, recta de calibração, repetibilidade e estudos de robustez mais aprofundados. O estudo mais alargado destes parâmetros é necessário para se proceder à validação do método para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados em óleo de soja, uma vez que, o método em causa neste trabalho é específico para óleo de girassol, mas poderá demonstrar-se útil para a análise de outros tipos de óleos vegetais;
- ❖ Se se verificar necessário proceder à validação deste método para outros tipos de óleos vegetais cujo volume de análises assim o justifique, tendo em conta que, este método pode ser mais abrangente do que apenas para a análise de óleo de girassol.

VI. Conclusões

Concluindo, verifica-se que a elaboração deste trabalho acerca da validação/implementação de um método para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados em óleo de girassol por cromatografia gasosa é de extrema importância em termos de controlo de qualidade alimentar, dada a diversidade de aplicações que o óleo mineral pode ter em termos alimentares, incluindo o facto de poder ser usado como aditivo, e tendo em conta que dados actuais mostram que este é um dos contaminantes alimentares mais encontrados, devendo esta análise ser expandida para outros tipos de alimentos onde a contaminação por este tipo de substâncias é significativa, como se referiu no início desta exposição.

Relativamente ao método implementado verificou-se que:

- A concentração de padrões conhecidos correlaciona-se linearmente com a resposta em termos de área normalizada correspondente a óleo mineral, sendo no entanto, necessária a realização de ensaios de verificação da estabilidade desta correlação, especialmente tendo em conta que os cálculos efectuados com recurso à recta de calibração não são coerentes com o outro modo de cálculo, recorrendo à expressão veiculada no método. Uma vez que, este método faz uso de um padrão interno, não seria necessário este tipo de análise, dado que este já funciona como uma referência para verificação da validade das medições efectuadas.
- A linearidade do método foi verificada entre as concentrações de 15 mg.kg^{-1} e 60 mg.kg^{-1} sendo que, qualquer valor que surja fora desta gama trata-se de extrapolação, o que em termos de incerteza associada à medição não deve acontecer, devendo-se, nestes casos, proceder à diluição da amostra.
- O método em causa permite uma sensibilidade de $0,0309 \text{ kg.mg}^{-1}$, valor que poderá ser usado para comparação com a sensibilidade de outros métodos ou outros analitos com o mesmo método.
- O método possui um limite de detecção de 21 mg.kg^{-1} e um limite de quantificação de 24 mg.kg^{-1} , que são valores satisfatórios dado estarem de acordo com o objectivo da implementação deste método, ou seja, o controlo da qualidade de óleos de girassol tendo em conta o limite imposto para a contaminação dos mesmos com óleo mineral – 50 mg.kg^{-1} .
- Tendo em conta o estudo de repetibilidade efectuado, o limite de repetibilidade deste método toma um valor de $6,11 \text{ mg.kg}^{-1}$, ou seja, a diferença entre dois replicados

efectuados em condições de repetibilidade não deve exceder $6,11 \text{ mg.kg}^{-1}$, para que o ensaio possa ser considerado válido.

- Numa análise de precisão intermédia, fazendo variar apenas os dias em que se efectuam as análises, verifica-se um desvio padrão de precisão intermédia de $0,48 \text{ mg.kg}^{-1}$, sendo este um valor razoável para a variabilidade dos resultados associados a este método específico.
- Para a avaliação da exactidão do método, recorrendo a ensaios interlaboratoriais, obtiveram-se valores de *Z*-score de 0,5 e 0,04, para uma amostra de óleo de girassol e outra de óleo de soja bruto, respectivamente, sendo estes valores satisfatórios. No entanto, os resultados obtidos por cada laboratório no ensaio interlaboratorial são dispersos (não tendo em conta as incertezas associadas a tais resultados, dado não terem sido facultadas), o que pode ser justificado pela integração efectuada em determinada análise, dado que, este método é muito sensível ao modo de integração. Confirmando a exactidão do método verificou-se também através de ensaios de recuperação, que este permite a obtenção de recuperações entre os 90 % e os 110 % (critério de aceitação estabelecido internamente) em amostras de óleo de girassol e de soja, quer bruto, quer refinado.
- A avaliação da robustez baseada numa análise qualitativa revelou que este é um método robusto, em que é necessária atenção aos pormenores, como o correcto armazenamento da sílica prateada e uma integração coerente com os critérios determinados, visto este ser um dos pontos-chave para a obtenção de resultados concordantes entre os vários ensaios efectuados ou mesmo em ensaios entre laboratórios, dado que, pequenas alterações na forma de integração da banda larga e posteriormente dos picos sobre essa banda podem originar diferenças significativas entre os vários resultados. Entre os vários estudos efectuados para averiguar a robustez do método verifica-se a necessidade de utilização de *n*-hexano próprio para cromatografia como eluente da cromatografia em coluna, uma vez que, o *n*-hexano de pureza analítica introduz impurezas na amostra analisada originando resultados distorcidos. Foi ainda testada a filtração de uma amostra contendo impurezas suspensas tendo-se verificado que é indiferente, em termos de sinal obtido, a filtração da amostra. Ainda neste âmbito deverá futuramente ser estudado o papel da evaporação do solvente recorrendo ao evaporador rotativo, visto haver indícios que corroboram a possibilidade de evaporação das cadeias mais curtas dos hidrocarbonetos de origem mineral durante esta operação. Para além disto, o software de integração utilizado revelou-se relevante para a obtenção de resultados coerentes, sendo especialmente importante o

estabelecimento de critérios objectivos de integração com o software em uso no momento.

- A comparação do método usado neste trabalho com a Norma ISO que futuramente regerá esta determinação permitiu verificar que em termos de robustez, não existem diferenças significativas entre ambas.
- Há necessidade de standardização dos métodos usados para efectuar esta determinação, dado que vários factores, como foi determinado na análise da robustez, podem alterar de forma significativa o resultado obtido - isto para que, os resultados facultados por vários laboratórios, para uma mesma análise sejam concordantes entre si. Esta standardização poderá ser alcançada pela Norma ISO ainda em fase de aprovação, que será o documento normativo no qual um laboratório se deverá basear para efectuar esta determinação.
- Existe a possibilidade de expansão deste método para outros óleos vegetais, como se verificou através de ensaios de recuperação e num circuito interlaboratorial para o óleo de soja, que não é o objecto de estudo explícito para o método em causa, que é específico para óleo de girassol.

Conclui-se, assim, que é fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objectivos para demonstrar, por meio de validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Neste caso específico, verifica-se que este método permite a obtenção de resultados confiáveis para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados de origem mineral em óleo de girassol, tendo em conta os resultados da validação. Ou seja, este método permite determinar se uma amostra específica está dentro dos limites legais em termos de qualidade alimentar neste parâmetro específico, permitindo assim, a sua comercialização.

VII. Referências bibliográficas

- ❖ Baldwin, M.K., Berry, P.H., Esdaile, D.J., Linnett, S.L., Martin, J.G., Peristianis, G.C., Priston, R.A.J., Simpson, B.J.E., Smith, J.D. (1992), *Feeding Studies in Rats with Mineral Hydrocarbon Food Grade White Oils*, Toxicologic Pathology, Vol. 20, nº 3, p. 426 – 435.
- ❖ Biedermann, M., Fiselier, K., Grob, K. (2009), *Aromatic Hydrocarbons of Mineral Oil Origin in Foods: Method for Determining the Total Concentration and First Results*, J. Agric. Food Chem., Vol. 57, p. 8711 – 8721.
- ❖ Biedermann, M., Grob, K. (2009), *Comprehensive two – dimensional GC after HPLC preseparation for the characterization of aromatic hydrocarbons of mineral oil origin in contaminated sunflower oil*, J. Sep. Sci., Vol. 32, p. 3726 – 3737.
- ❖ Biedermann, M., Grob, K. (2009), *How “white” was the mineral oil in the contaminated Ukrainian sunflower oils?*, Eur. J. Lipid Sci. Technol., Vol. 111, p. 313 – 319.
- ❖ Brito, N.M., Junior, O.P., Polese, L., Ribeiro, M.L. (2003), *Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão*, R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Vol. 13, p. 129-146.
- ❖ Bulder, A.S., Hoogenboom, L.A.P., Kan, C.A., Raamsdonk, L.W.D., Traag, W.A., Bouwmeester, H. (2008), *Risk assessment of Nickel, Mineral Oils, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Volatile Organic Compounds in animal feed materials*, Rikilt – Institute of Food Safety, p. 22 – 34.
- ❖ Camões, M.F.G.F.C. (2001), *Quantificação da Incerteza nas Medições Analíticas*, Versão em Português do Guia Eurachem/CITAC – Tradução e adaptação da 2ª edição, Outubro.
- ❖ Carvalho, M.A. (2010), *Girassol*, Conab – Companhia Nacional de Abastecimento – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, Junho.
- ❖ Concin, N., Hofstetter, G., Plattner, B., Tomovski, C., Fiselier, K., Gerritzen, K., Fessler, S., Windbichler, G., Zeimet, A., Ulmer, H., Siegl, H., Rieger, K., Concin, H., Grob, K. (2008), *Mineral oil paraffins in human body fat and milk*, Food and Chemical Toxicology, Vol. 46, p. 544 – 552.
- ❖ Coordenação Geral de Acreditação (2010), *Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos – DOQ-CGCRE-008*, Revisão 03, Fevereiro.

- ❖ Dias, J.M.S. (2009), *Quantificação de Furanos por Cromatografia Gasosa*, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- ❖ Droz, C., Grob, K. (1997), *Determination of food contamination by mineral oil material from printed cardboard using on-line coupled LC-GC-FID*, *Z Lebensm Unters Forsch A*, Vol. 205, p. 239 – 241.
- ❖ EFSA – European Food Safety Authority (2004), *Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) on request from the Commission related the use of mineral oils in jute and sisal bags*, *EFSA Journal*, Vol. 162, p. 1 – 6.
- ❖ EFSA - European Food Safety Authority (2008), *EFSA statement on the contamination of sunflower oil with mineral oil exported from Ukraine*, EFSA.
- ❖ EFSA - European Food Safety Authority (2008), *Initial considerations for toxicological risks related to sunflower oil contamination with mineral oil*, consultado em http://www.efsa.europa.eu/it/news/documents/sunfloweroil_mineraloil.pdf, acedido a 3 de Maio de 2011.
- ❖ EFSA – European Food Safety Authority (2009), *Scientific Opinion on the use of high viscosity white mineral oils as food additive*, *EFSA Journal*, 7 (11):1387, p. 1 – 39.
- ❖ EFSA, *Contamination of mineral oil in sunflower oil from Ukraine*, consultado em http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_normativa_1670_ulterioriallegati_ulterioreallegato_0_alleg.pdf, acedido a 3 de Maio de 2011.
- ❖ Eurachem (1998), *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*.
- ❖ Faleiro, H.T., Júnior, R.P.S., Silva, L.F. (2001), *Caracterização de grãos de girassol (Helianthus annuus L.) ao longo do período de colheita em dois municípios do estado de Goiás*, *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Vol. 31(2), p. 163 – 168.
- ❖ FAO Investment Centre/EBRD Cooperation Programme (2002), *Ukraine - Review of the Sunflower Oil Sector*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Nº 2, Novembro.

- ❖ Fiorini, D., Fiselier, K., Biedermann, M., Ballini, R., Coni, E., Grob, K. (2008), *Contamination of Grape Seed Oil with Mineral Oil Paraffins*, J. Agric. Food Chem., Vol. 56, p. 11245 – 11250.
- ❖ Fiorini, D., Paciaroni, A., Gigli, F., Ballini, R. (2010), *A versatile splitless injection GC-FID method for the determination of mineral oil paraffins in vegetable oils and dried fruit*, Food Control, Vol. 21, p. 1155-1160.
- ❖ Fiselier, K., Grob, K. (2009), *Determination of mineral oil paraffins in foods by on-line HPLC-GC-FID: lowered detection limit; contamination of sunflower seeds and oils*, Eur Food Res Technol, Vol. 229, p. 679 – 688.
- ❖ Freire, D.B.P. (2002), *Controlo de Qualidade de Óleos Vegetais Comercializados na Região do Grande Porto*, Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, Porto.
- ❖ Grompone, M.A. (2005), *Sunflower Oil*, consultado em http://uqu.edu.sa/files2/tiny_mce/plugins/filemanager/files/4281709/84607_29.pdf, acedido a 15 de Março de 2011.
- ❖ Grosvenor, M.B., Smolin, L.A. (2002), *Nutrition: From Science to Life*, Harcourt College Publishers, Estados Unidos da América, p. 137 – 171.
- ❖ Grundböck, F., Fiselier, K., Schmid, F., Grob, K. (2010), *Mineral oil in sunflower seeds: the sources*, Eur Food Res Technol, Vol. 231, p. 209 -213.
- ❖ Guiné, R.P.F., Henriques, F. (2011), *O Papel dos Ácidos Gordos na Nutrição Humana e Desenvolvimentos Sobre o Modo Como Influenciam a Saúde*, Millenium, 40, p. 7 – 21.
- ❖ Heimbach, J.T., Bodor, A.R., Douglass, J.S., Barraj, L.M., Cohen, S.C., Biles, R.W., Faust, H.R. (2002), *Dietary exposures to mineral hydrocarbons from food-use applications in the United States*, Food and Chemical Toxicology, Vol. 40, p. 555 – 571.
- ❖ Instituto de La Grasa (2008), *Determinación de Hidrocarburos Alifáticos Saturados en Aceites de Girasol mediante Cromatografía de Gases en Columna Capilar con Inyección “on column” y detector FID*, Sevilha, Julho.
- ❖ Instituto Nacional de Estatísticas (2011), *Estatísticas Agrícolas 2010*.

- ❖ IPAC – Instituto Português de Acreditação (2005), *Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos*, OGC002.
- ❖ IPAC – Instituto Português de Acreditação (2007), *Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos*, OGC007.
- ❖ Karasek, L., Wenzl, T., Ulberth, F. (2010), *Proficiency test on the determination of mineral oil in sunflower oil*, Eur. J. Lipid Sci. Technol., Vol. 112, p. 321-332.
- ❖ Karleskind, A. (1996), *Oils and Fats Manual: A Comprehensive Treatise – Properties, Production and Applications*, Volume 1, Intercept Limited, Londres, p. 118 – 124 e p. 134 - 139.
- ❖ Kvasnicová, V., Balínová, P.(2006), *Practical Trainings from Medical Chemistry and Biochemistry*, Institute of Biochemistry, Cell and Molecular Biology, Reino Unido, consultado em http://old.lf3.cuni.cz/chemie/english/practical_trainings/task_B2.htm, acedido a 10 de Setembro de 2010.
- ❖ Lopes, I.M.G. (2000), *Extracção e Caracterização do Óleo de Bolota*, Dissertação apresentada para a obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- ❖ Moraes, F. P., Colla, L. M. (2006), *Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: Definições, Legislação e Benefícios à Saúde*, Revista Electrónica de Farmácia, Vol. 3 (2), p. 109 – 122.
- ❖ Moret, S., Grob, K., Conte, L.S. (1996), *On-line high-performance liquid chromatography – solvent evaporation – high – performance liquid chromatography – capillary gas chromatography – flame ionization detection for the analysis of mineral oil polyaromatic hydrocarbons in fatty foods*, Journal of Chromatography A., Vol. 750, p. 361 – 368.
- ❖ Moret, S., Grob, K., Conte, L.S. (1997), *Mineral oil polyaromatic hydrocarbons in foods, e.g. from jute bags, by on-line LC-solvent evaporation (SE)-LC-GC-FID*, Z Lebensm Unters Forsch A, Vol. 204, p.241 – 246.
- ❖ Nash, J.F., Gettings, S.D., Diembeck, W., Chudowski, M., Kraus, A.L. (1996), *A Toxicological Review of Topical Exposure to White Mineral Oils*, Fd Chem. Toxic., Vol. 34, nº 2, p. 213-225.

- ❖ National Sunflower Association, *Sunflower sustainability: the substance behind the seed*, consultado em http://www.sunflowernsa.com/uploads/resources/540/sustainability-use_layout-1.pdf, acedido a 14 de Março de 2011.
- ❖ Neukom, H-P., Grob, K., Biedermann, M., Noti, A. (2002), *Food contamination by C₂₀ – C₅₀ mineral paraffins from the atmosphere*, Atmospheric Environment, Vol. 36, p. 4839 – 4847.
- ❖ Nicholas, D., *The Analysis of Mineral Oil in Sunflower Oil*, GL Sciences Company, consultado em http://www.atasgl.com/ap-note/070_DMI%20Sunflower%20Oil.pdf, acedido a 5 de Junho de 2011.
- ❖ Norma ISO/TC 34/SC 11/WG – *Animal and Vegetable fats and oils: Determination of aliphatic hydrocarbons in vegetable oils* (2011).
- ❖ Office Luxembourgeois D'Accreditation et de Surveillance (2008), A011 – *Guidelines for checking and validating test and calibration methods according to ISO/IEC 17025*, version 04.
- ❖ RaB, M., Schein, C., Matthäus, B. (2008), *Virgin sunflower oil*, Wiley InterScience, Alemanha.
- ❖ Reda, S.Y., Carneiro, P.I.B. (2007), *Óleos e Gorduras: Aplicações e Implicações*, Revista Analytica, nº 27, p. 60 – 67.
- ❖ Relacre – Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (1996), *Guia Relacre 3: Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*, Relacre.
- ❖ Relacre – Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (2000), *Guia Relacre 13: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, Relacre.
- ❖ Ribeiro, E.P., Seravalli, E.A.G. (2007), *Química de Alimentos*, 2ª Edição Revista, Instituto Mauá de Tecnologia, Editora Edgard Blücher, São Paulo.
- ❖ Rosillo-Calle, F., Pelkmans, L., Walter, A. (2009), *A Global Overview of Vegetable Oils, with Reference to Biodiesel – A Report for the IEA Bioenergy Task 40*, IEA Bioenergy, p. 8 – 30.

- ❖ Silva, S.R.G.P. (2001), *Estudo da Formação dos Isómeros Trans durante o Processo de Refinação do Óleo de Soja*, Relatório do trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agro - Industrial, Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- ❖ Skoog, Holler, Nieman (1998), *Principles of Instrumental Analysis* - Fifth Edition, Harcourt College Publishers, p. 701-721.
- ❖ Tennant, D.R. (2004), *The usage, occurrence and dietary intakes of white mineral oils and waxes in Europe*, Food and Chemical Toxicology, Vol. 42, p. 481 – 492.
- ❖ The AOCS Lipid Library (2011), *Oils and Fats in the Market Place: Commodity Oils and Fats – Soybean Oil*, consultado em <http://lipidlibrary.aocs.org/market/soybean.htm>, aceso a 25 de Agosto de 2011.
- ❖ Ventura, G.T., Kenig, F., Reddy, C.M., Frysinger, G.S., Nelson, R.K., Mooy, B.V., Gaines, R.B. (2008), *Analysis of unresolved complex mixtures of hydrocarbons extracted from Late Archean sediments by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC)*, Organic Geochemistry, Vol. 39, p. 846-867.
- ❖ Viola, P. (1970), *Fats in the Human Diet: Olive Oil*, International Olive Oil Council, Industrias Asenga, Madrid.
- ❖ Vollmer, A., Biedermann, M., Grundböck, F., Ingenhoff, J-E., Biedermann-Brem, S., Altkofer, W., Grob, K. (2011), *Migration of mineral oil from printed paperboard into dry foods: survey of the German market*, Eur Food Res Technol, Vol. 232, p. 175-182.
- ❖ Wolf, W.J., Cowan, J.C. (1975), *Soybeans as a Food Source*, CRC Press, Florida.

ANEXO A: Cromatogramas referentes ao estudo da linearidade do método.

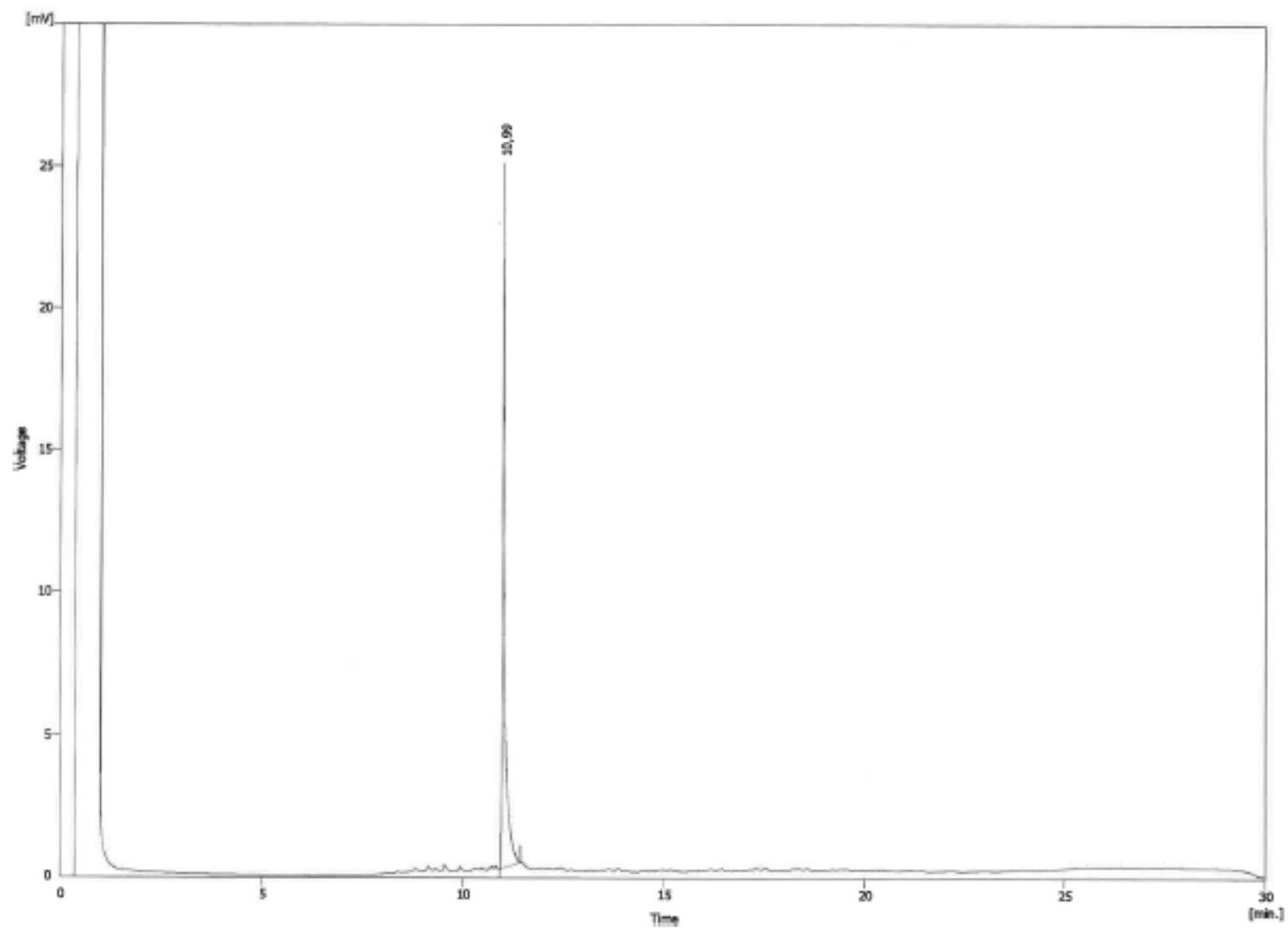


Figura A1: Cromatograma referente ao branco deste estudo.

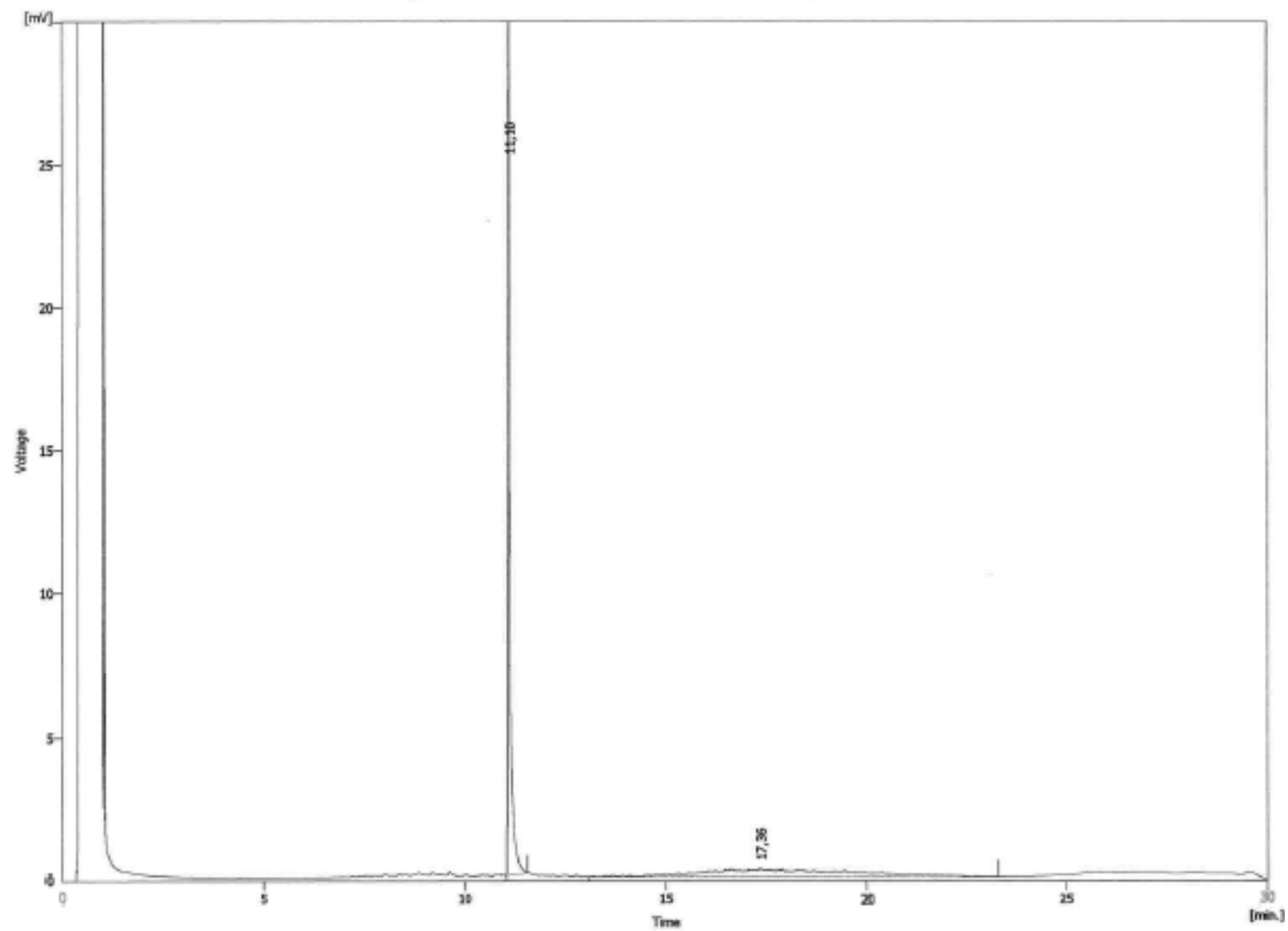


Figura A2: Cromatograma referente ao padrão de $22,5 \text{ mg.kg}^{-1}$.

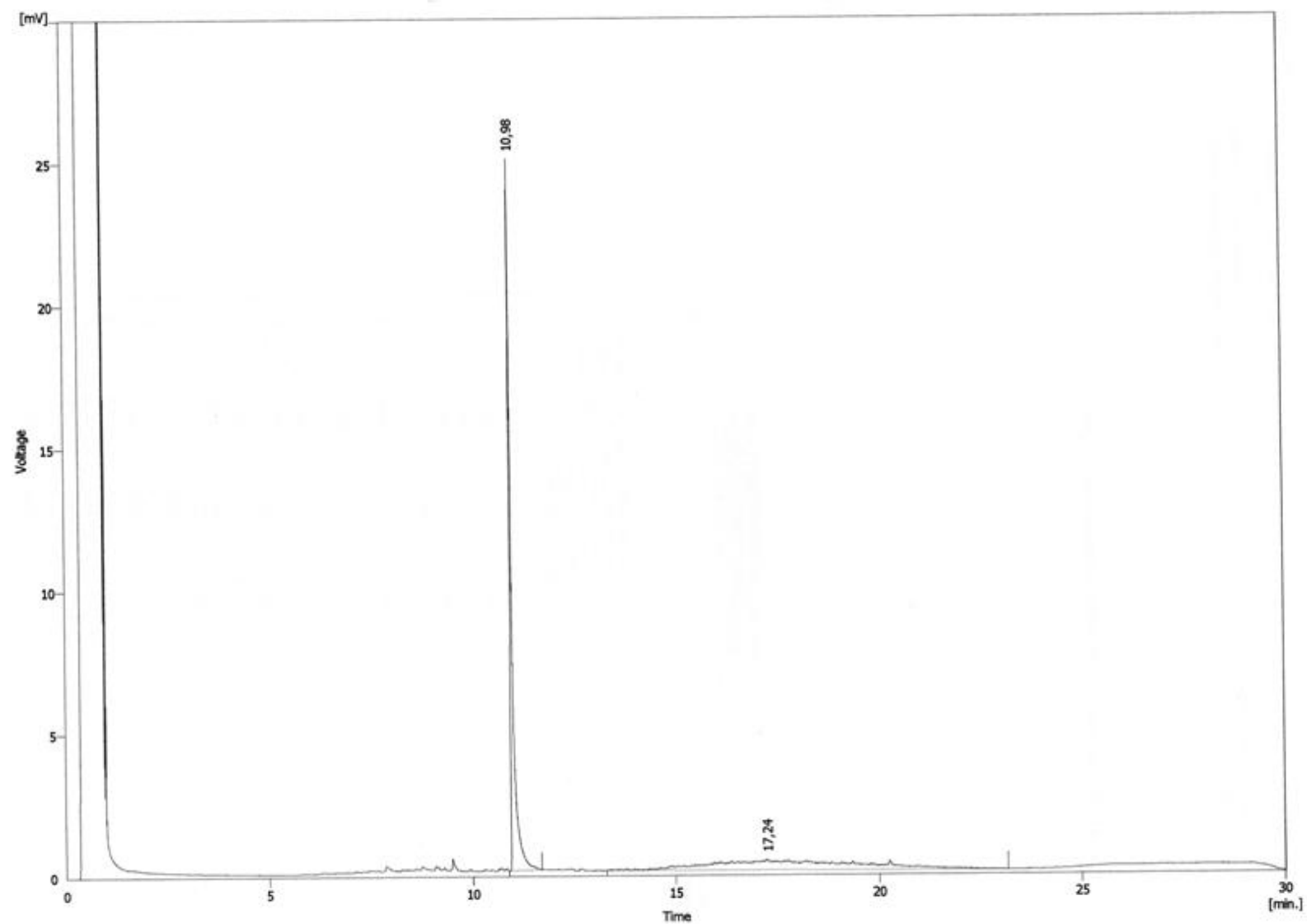


Figura A3: Cromatograma referente ao padrão de 30 mg.kg^{-1} .

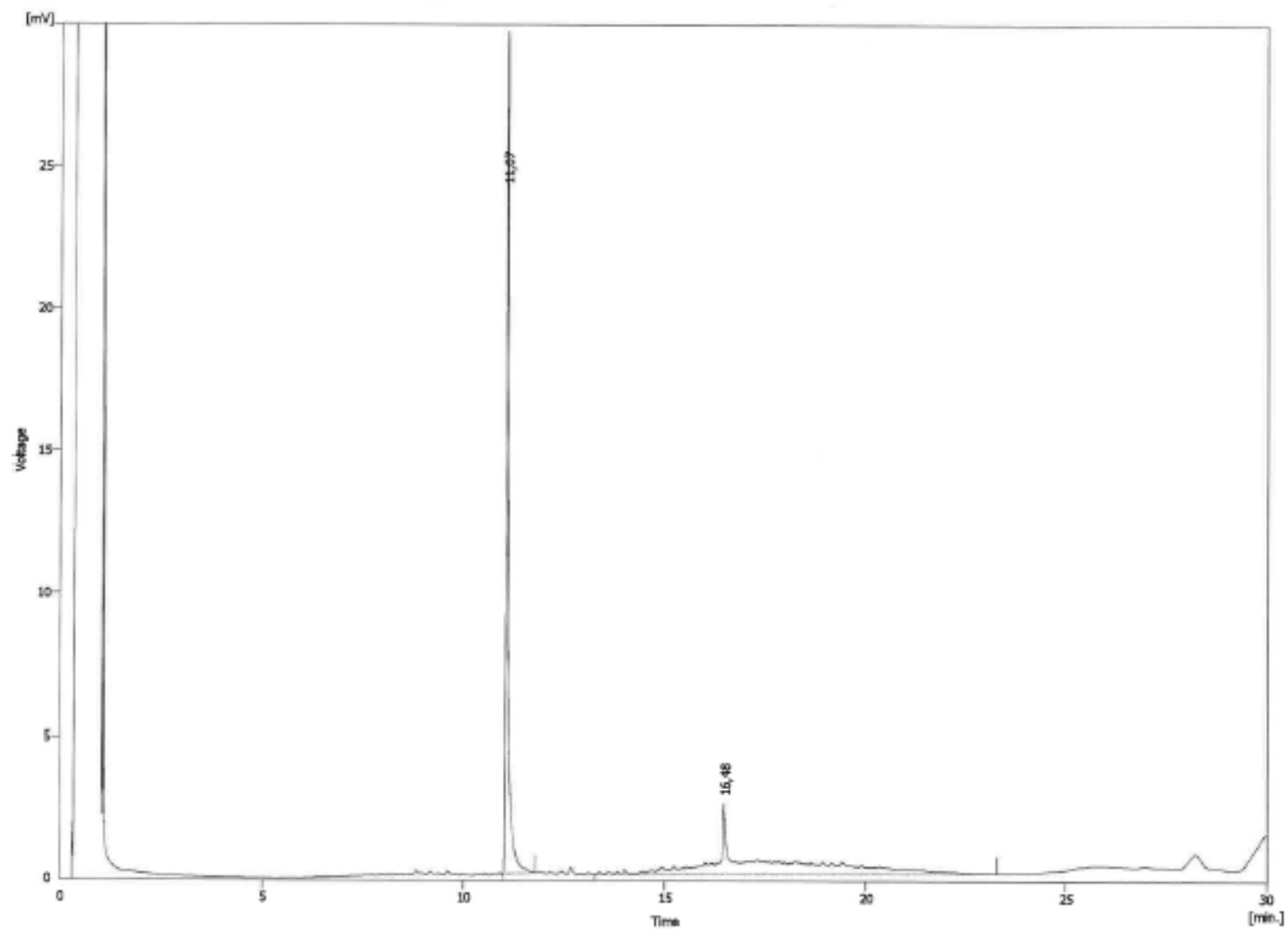


Figura A4: Cromatograma referente ao padrão de $37,5 \text{ mg.kg}^{-1}$.

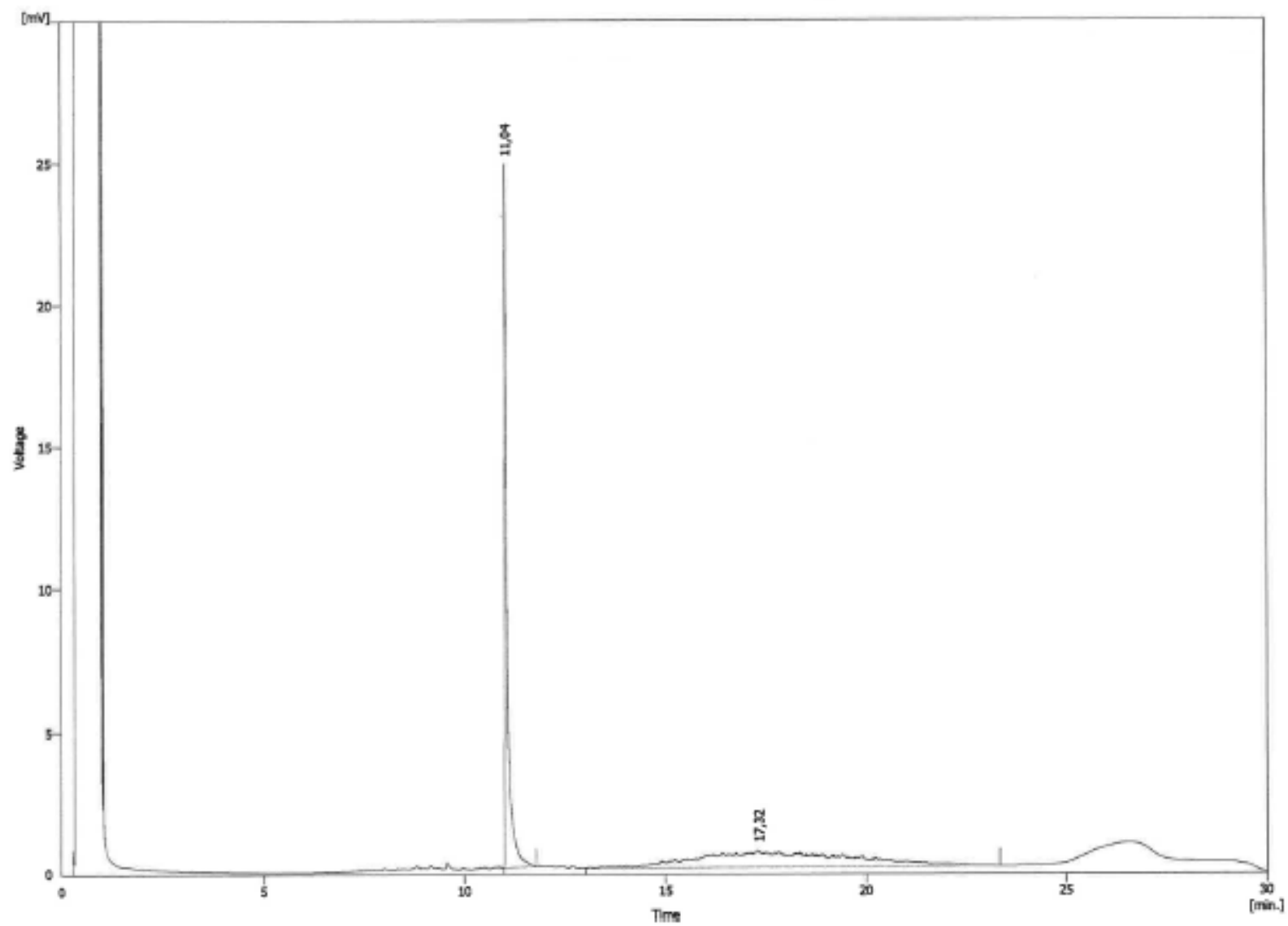


Figura A5: Cromatograma referente ao padrão de 45 mg.kg^{-1} .

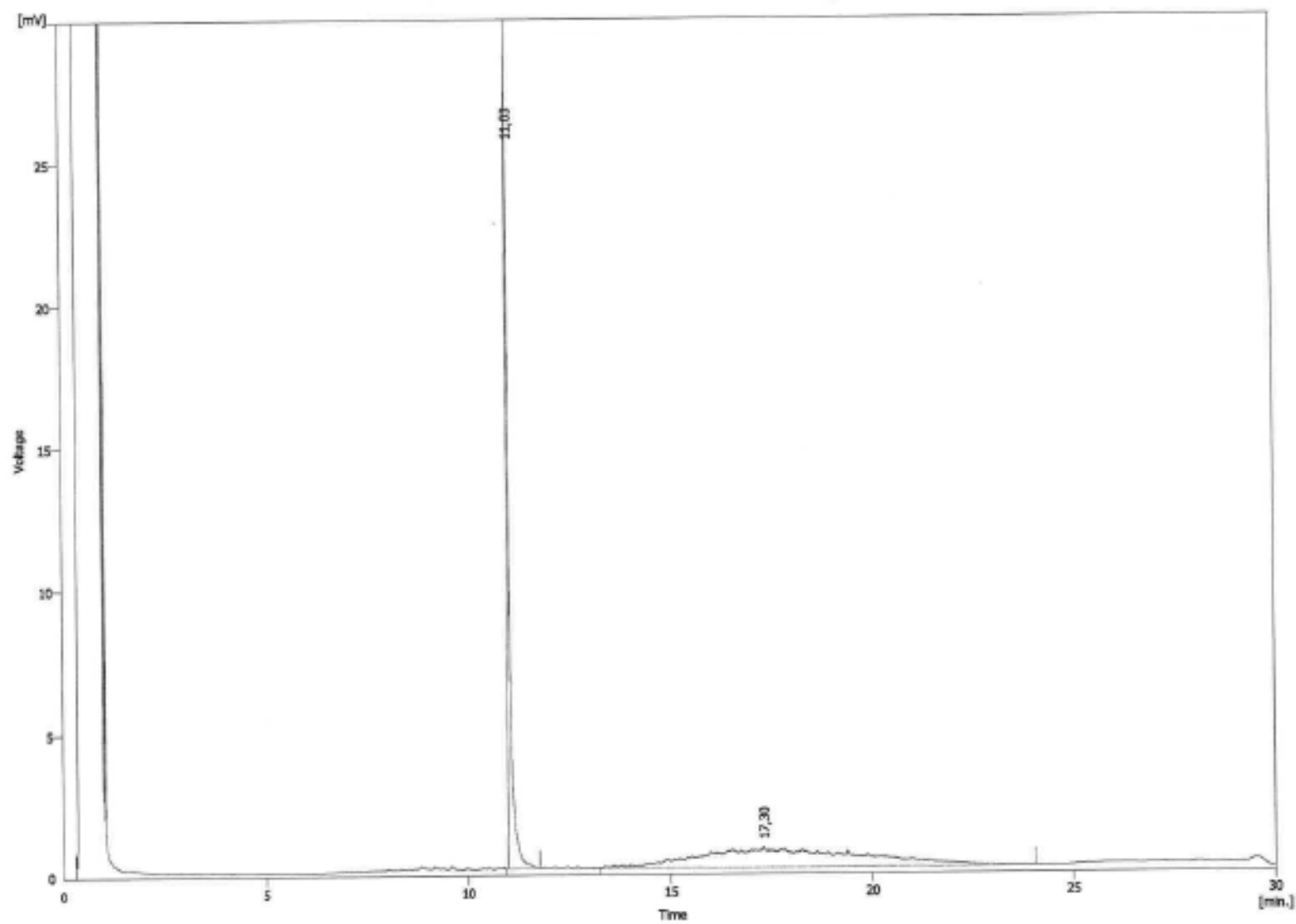


Figura A6: Cromatograma referente ao padrão de $52,5 \text{ mg.kg}^{-1}$.

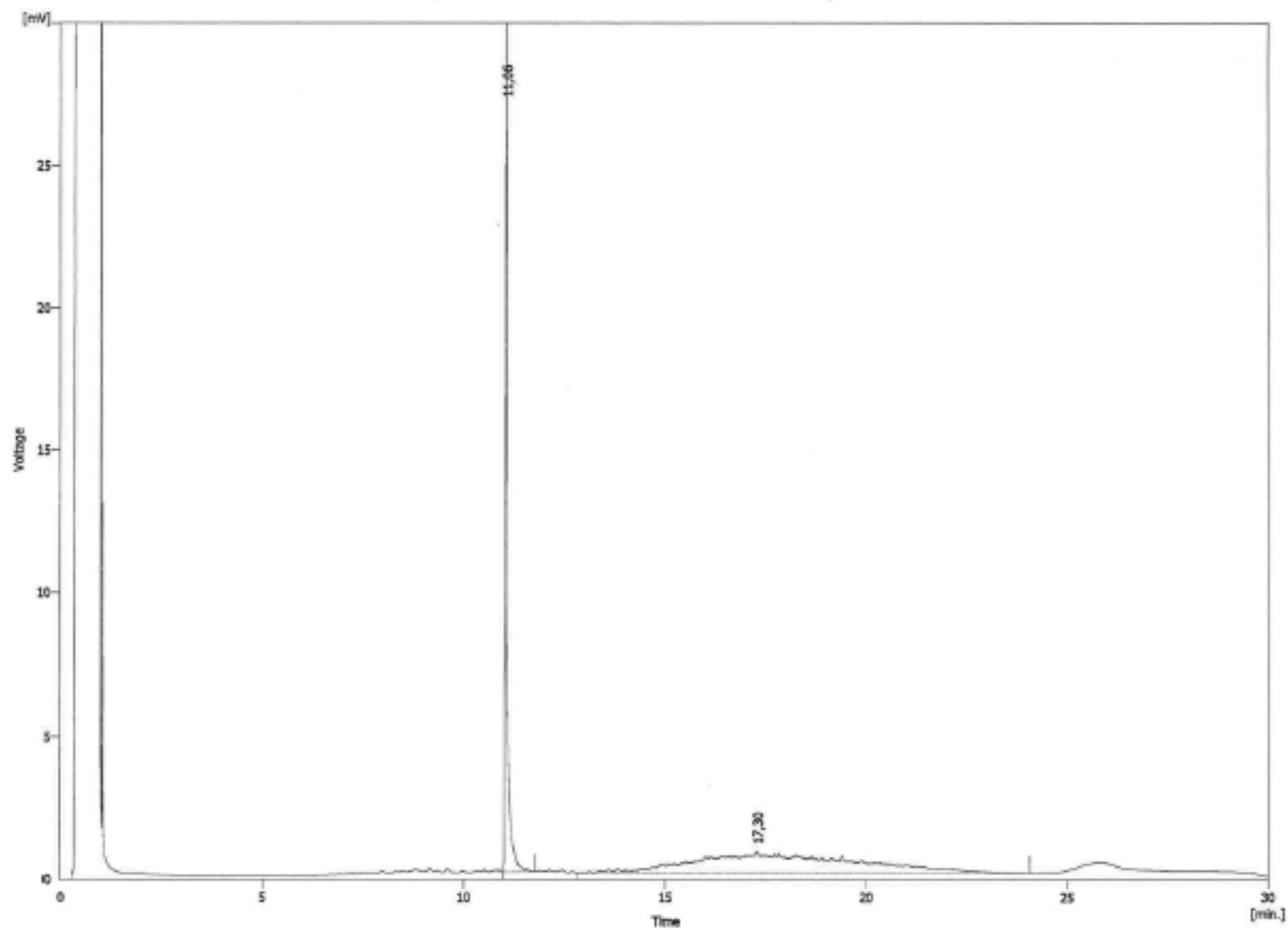


Figura A7: Cromatograma referente ao padrão de 60 mg.kg^{-1} .

ANEXO B: Cromatograma referente à determinação dos limiares analíticos.

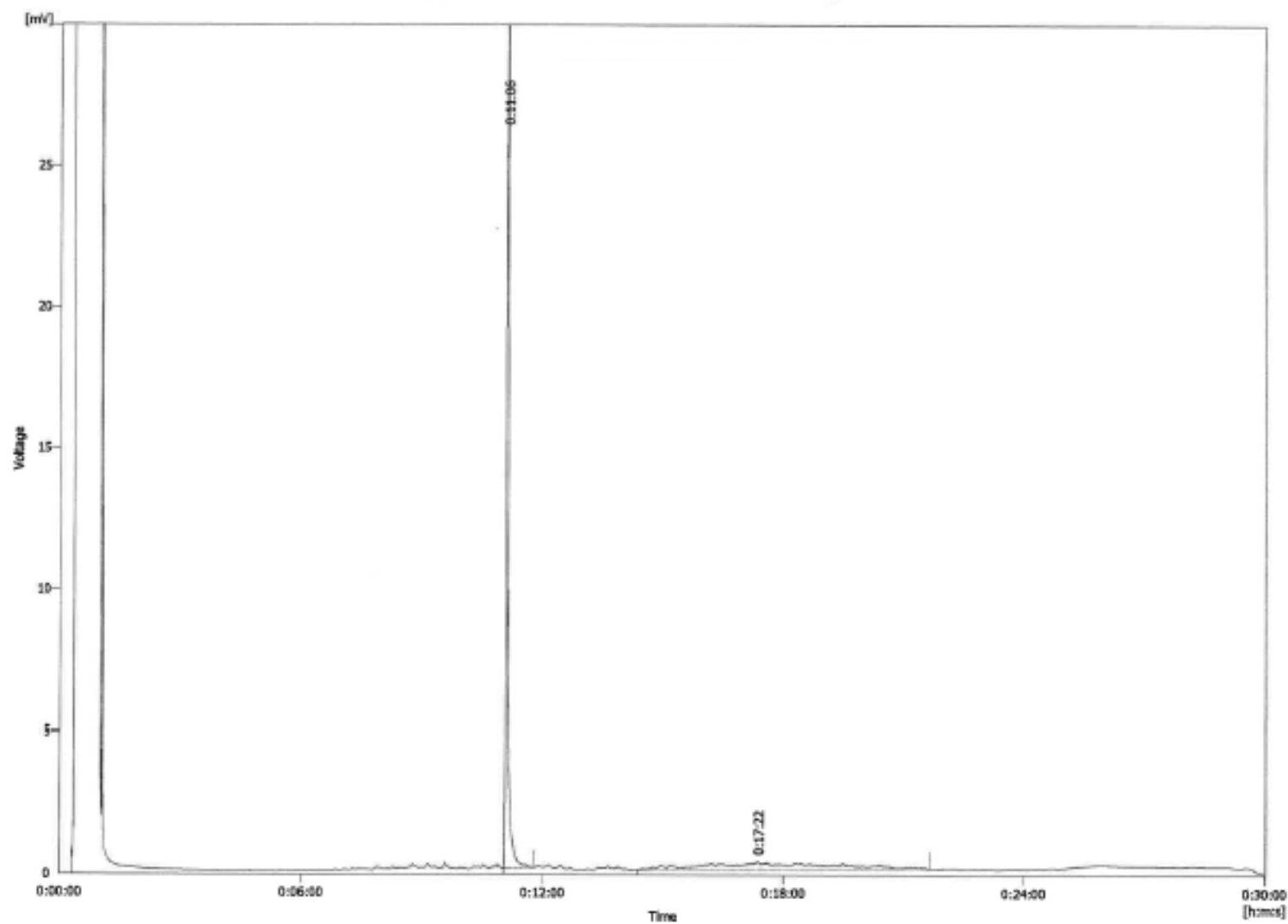


Figura B: Cromatograma referente a um padrão de 15 mg.kg^{-1} .

ANEXO C: Cromatograma referente ao estudo da repetibilidade do método.

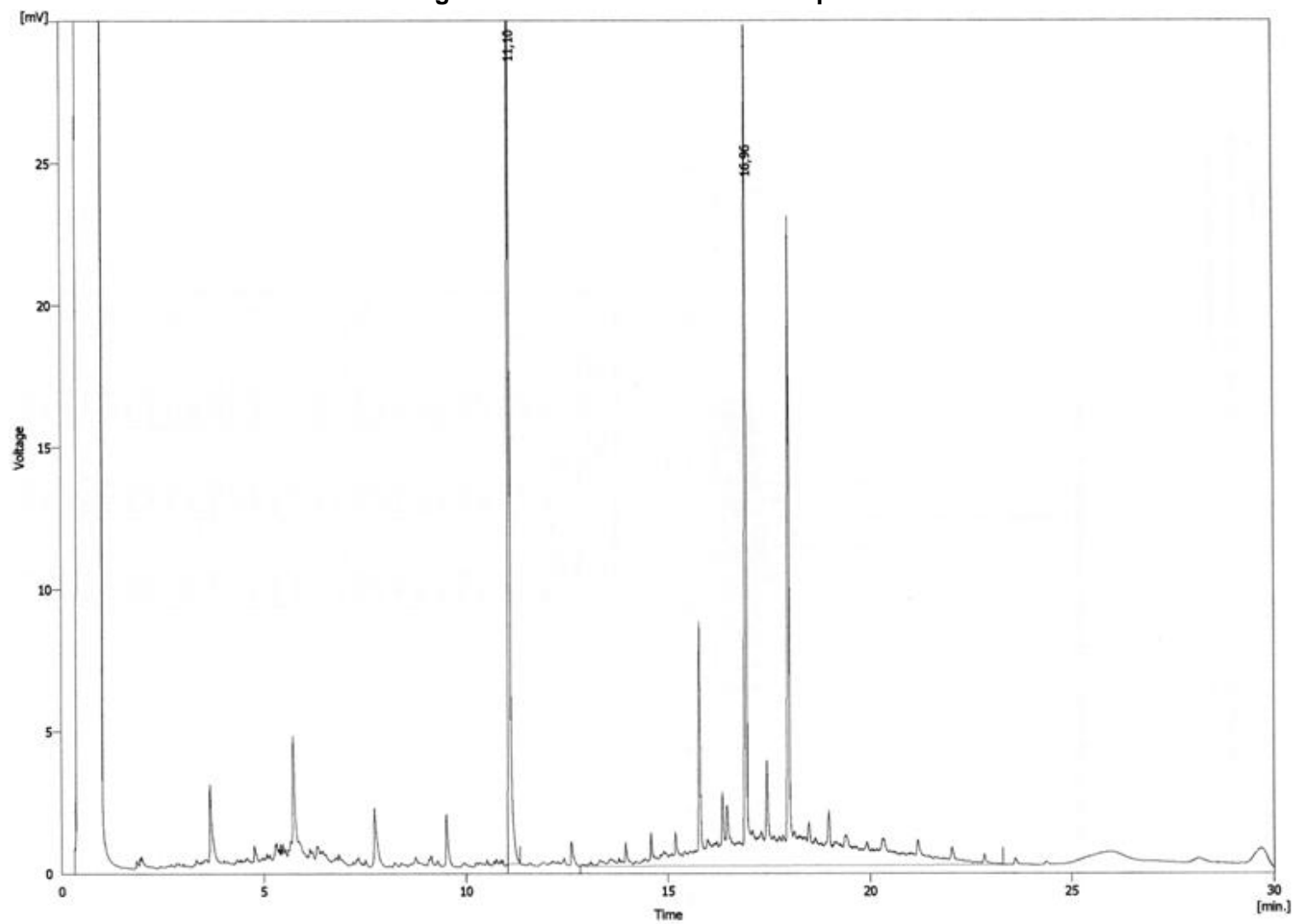


Figura C: Cromatograma referente a uma amostra de óleo de girassol refinado.

ANEXO D: Cromatogramas referentes ao estudo da exactidão do método.

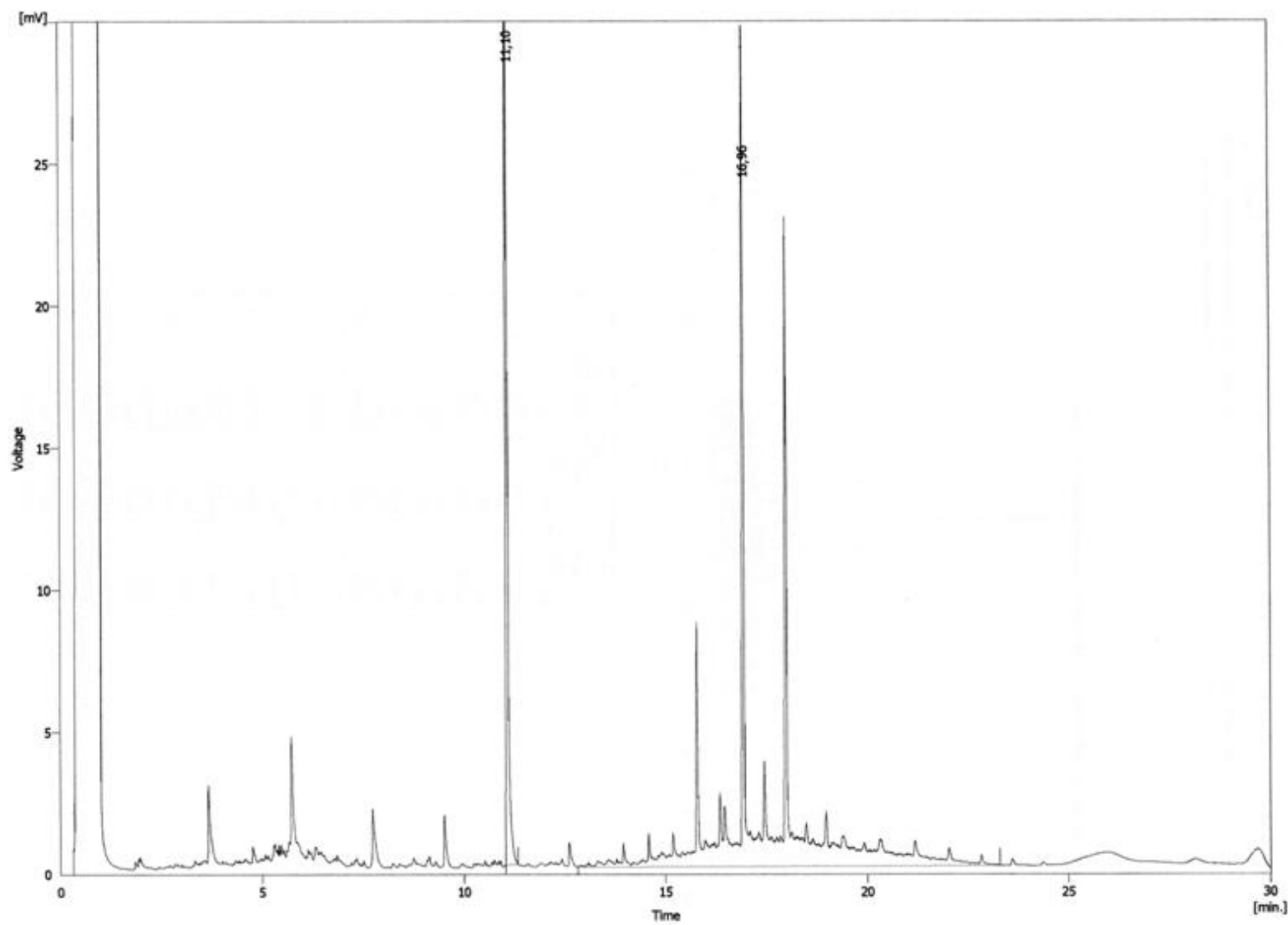


Figura D1: Cromatograma referente à amostra de óleo de girassol refinado analisada no ensaio interlaboratorial.

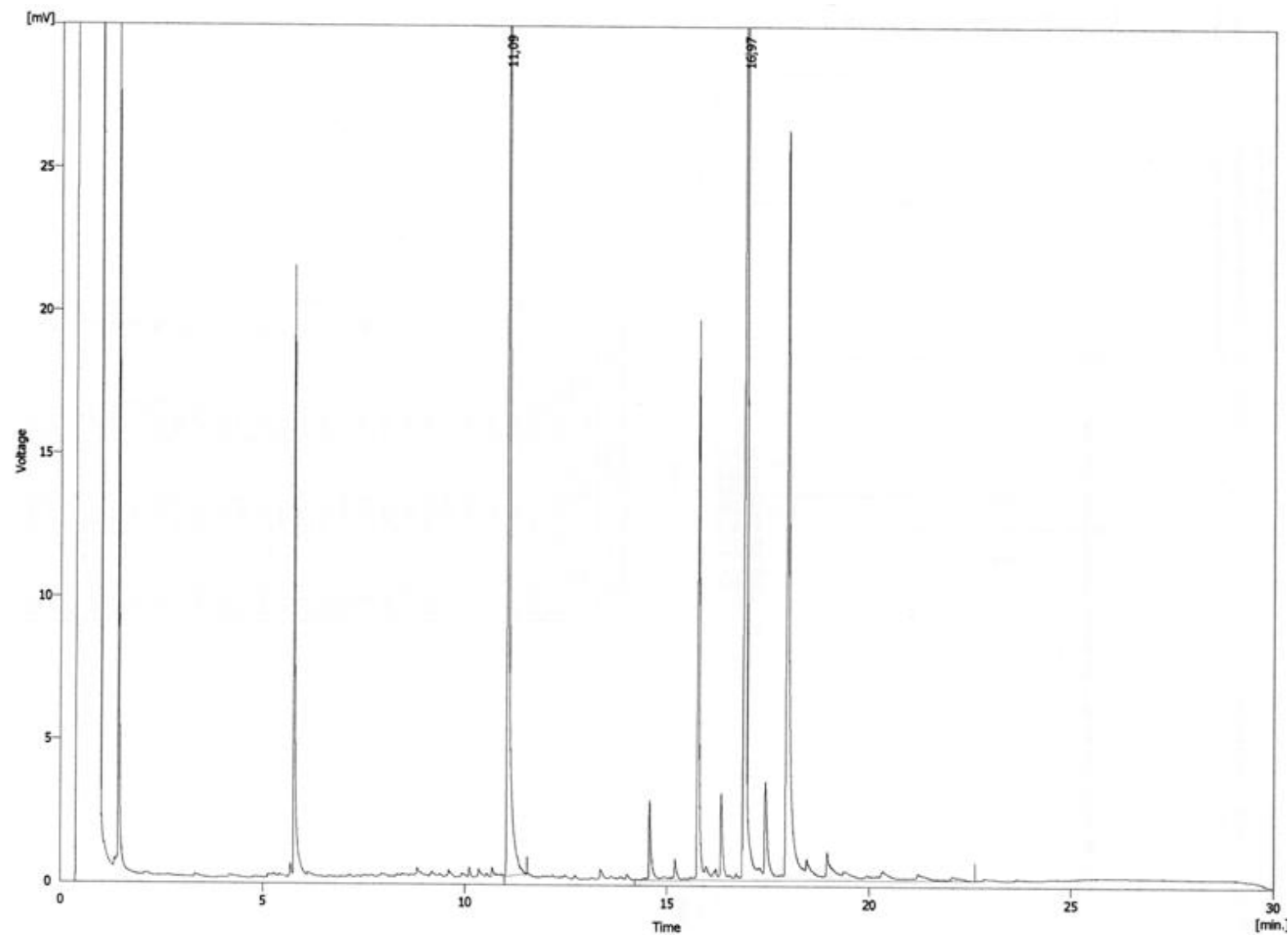


Figura D2: Cromatograma referente à amostra de óleo de girassol bruto de controlo, analisada no teste de recuperação.

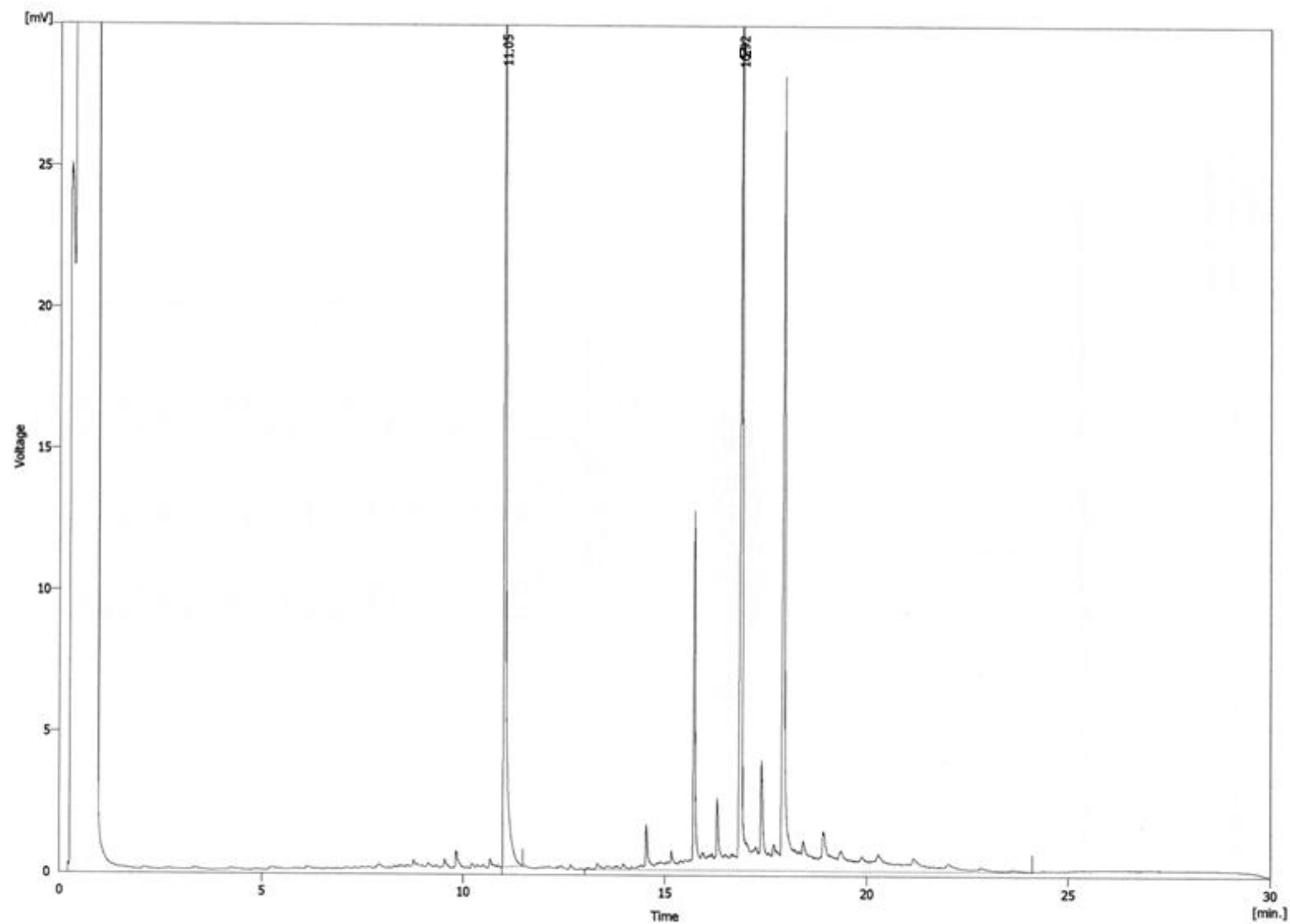


Figura D3: Cromatograma referente à amostra de óleo de girassol refinado fortificado com 50 mg.kg^{-1} , analisada no teste de recuperação.

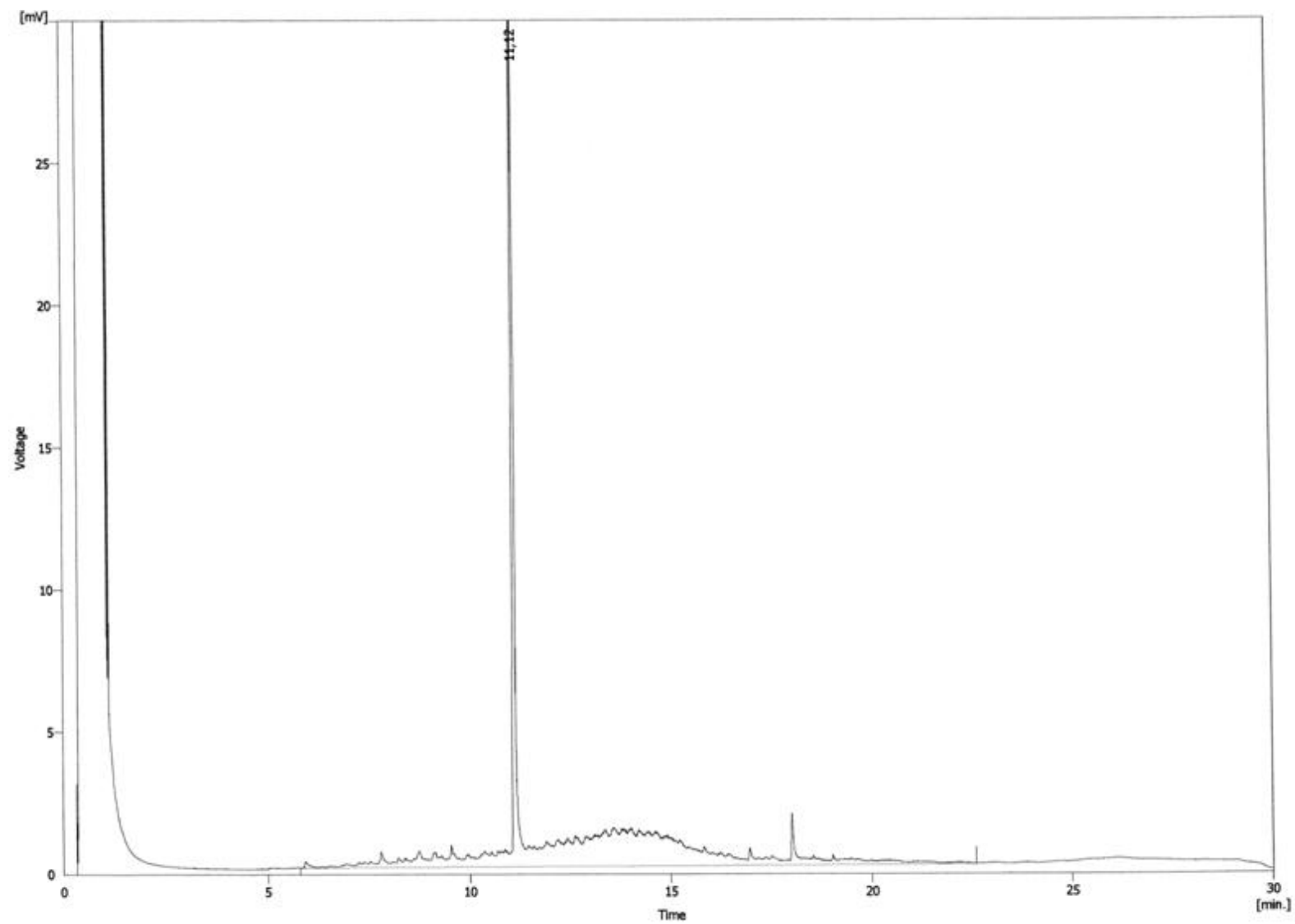


Figura D4: Cromatograma referente à amostra de óleo de soja bruto de controlo, analisada no teste de recuperação.

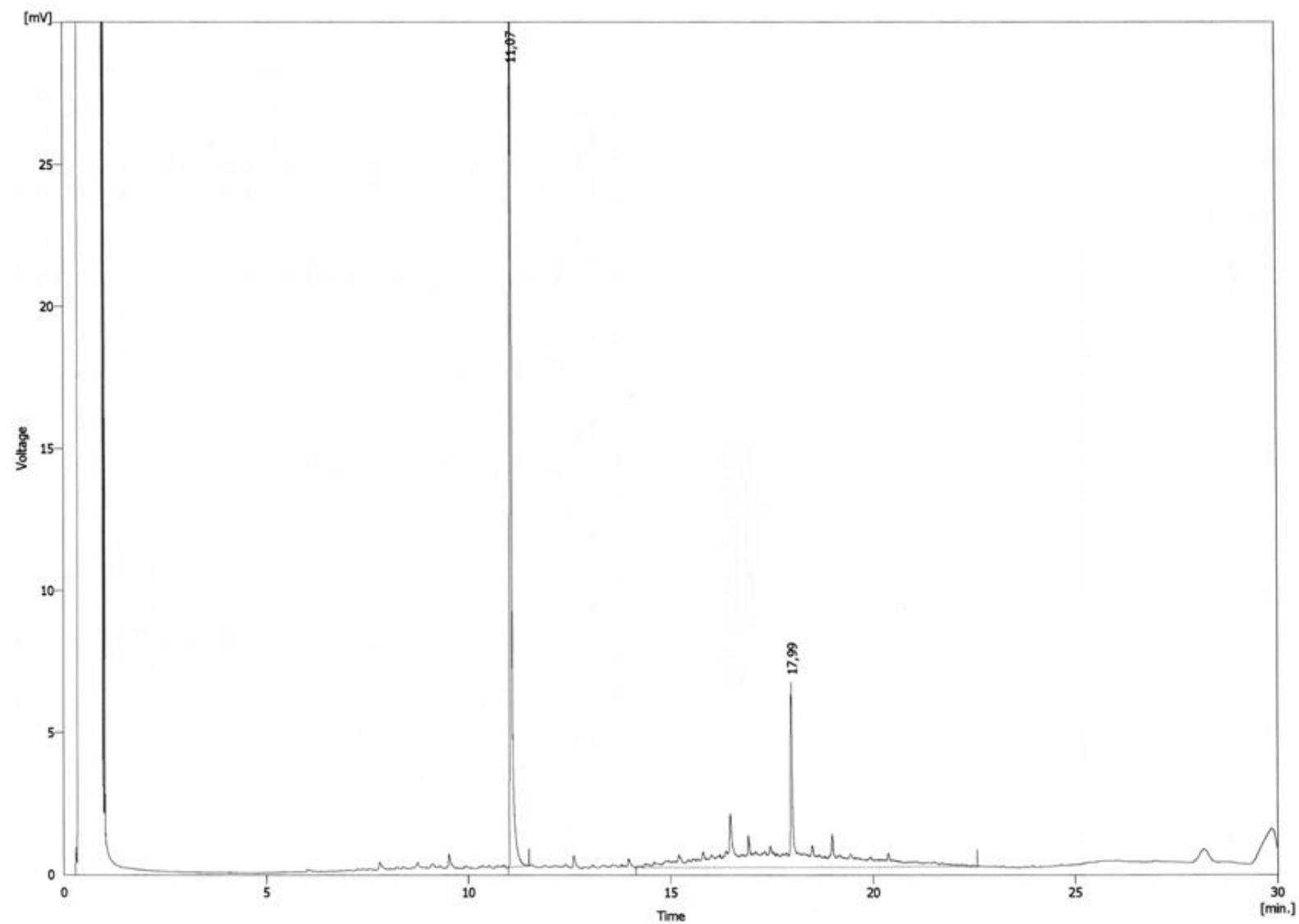
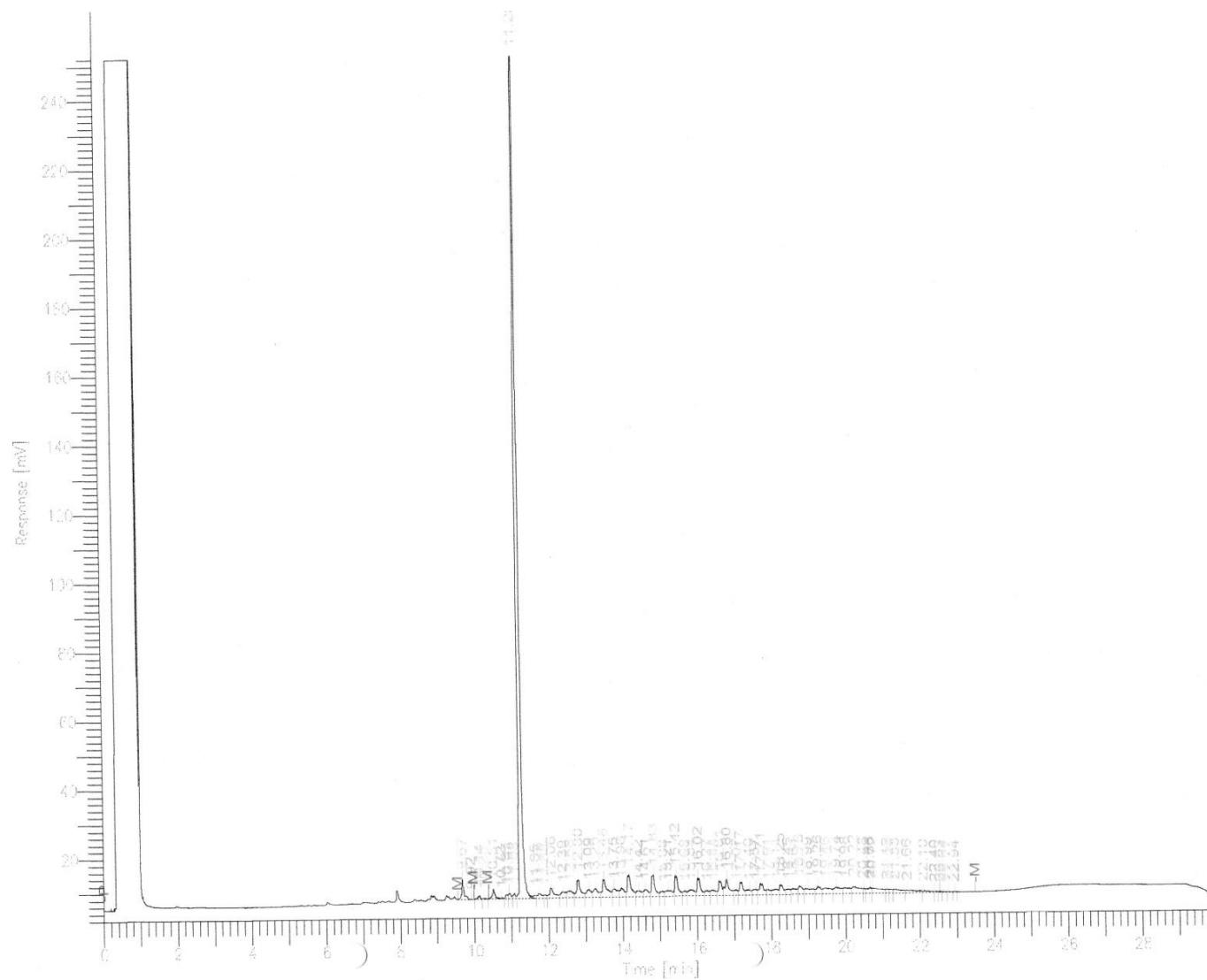
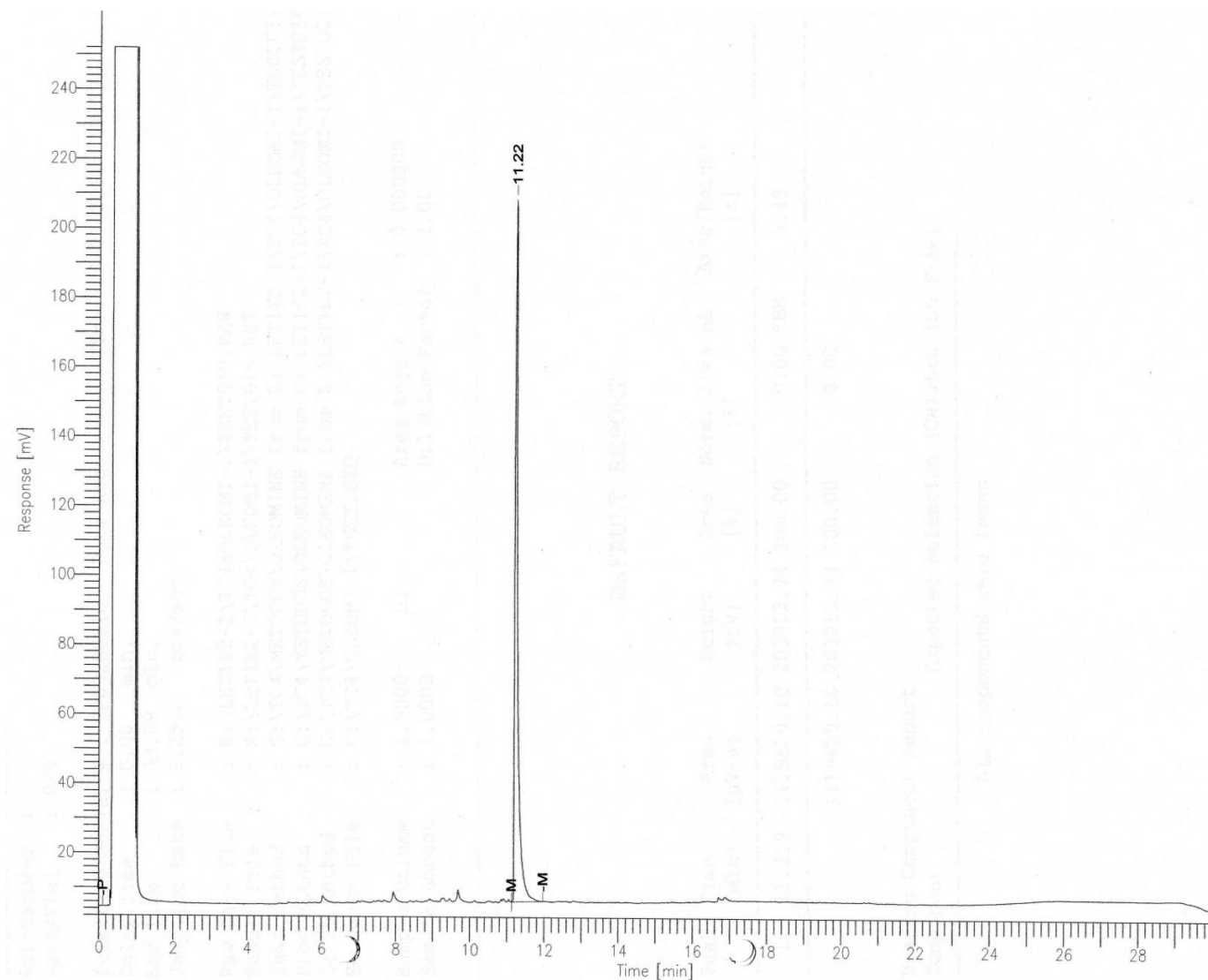


Figura D5: Cromatograma referente à amostra de óleo de soja refinado fortificado com 50 mg.kg^{-1} , analisada no teste de recuperação.

ANEXO E: Cromatogramas referentes ao estudo da robustez do método.



E1: Cromatograma referente à análise do branco utilizando n-hexano de pureza analítica.



E2: Cromatograma referente à análise do branco utilizando n-hexano próprio para cromatografia.

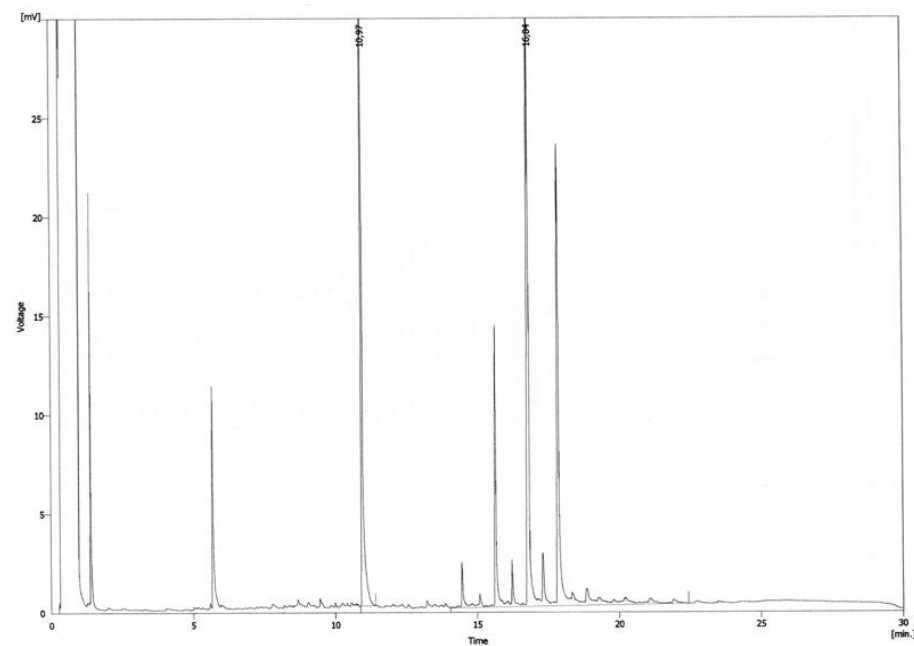
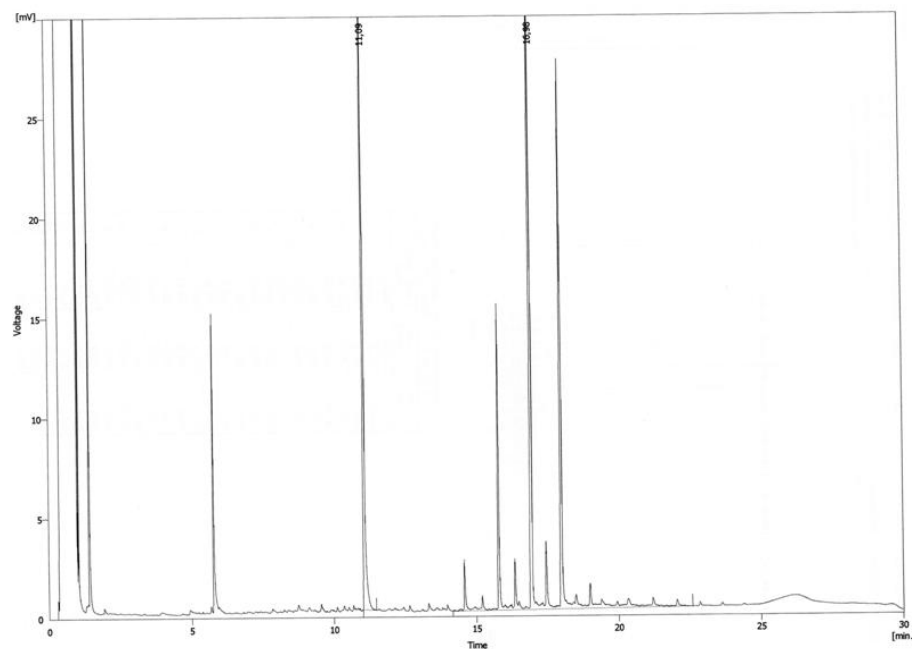


Figura E3: Cromatogramas referentes ao estudo da necessidade de filtração de amostras contendo impurezas, na análise de uma amostra de óleo de girassol bruto sem filtração (à esquerda) e com filtração (à direita).

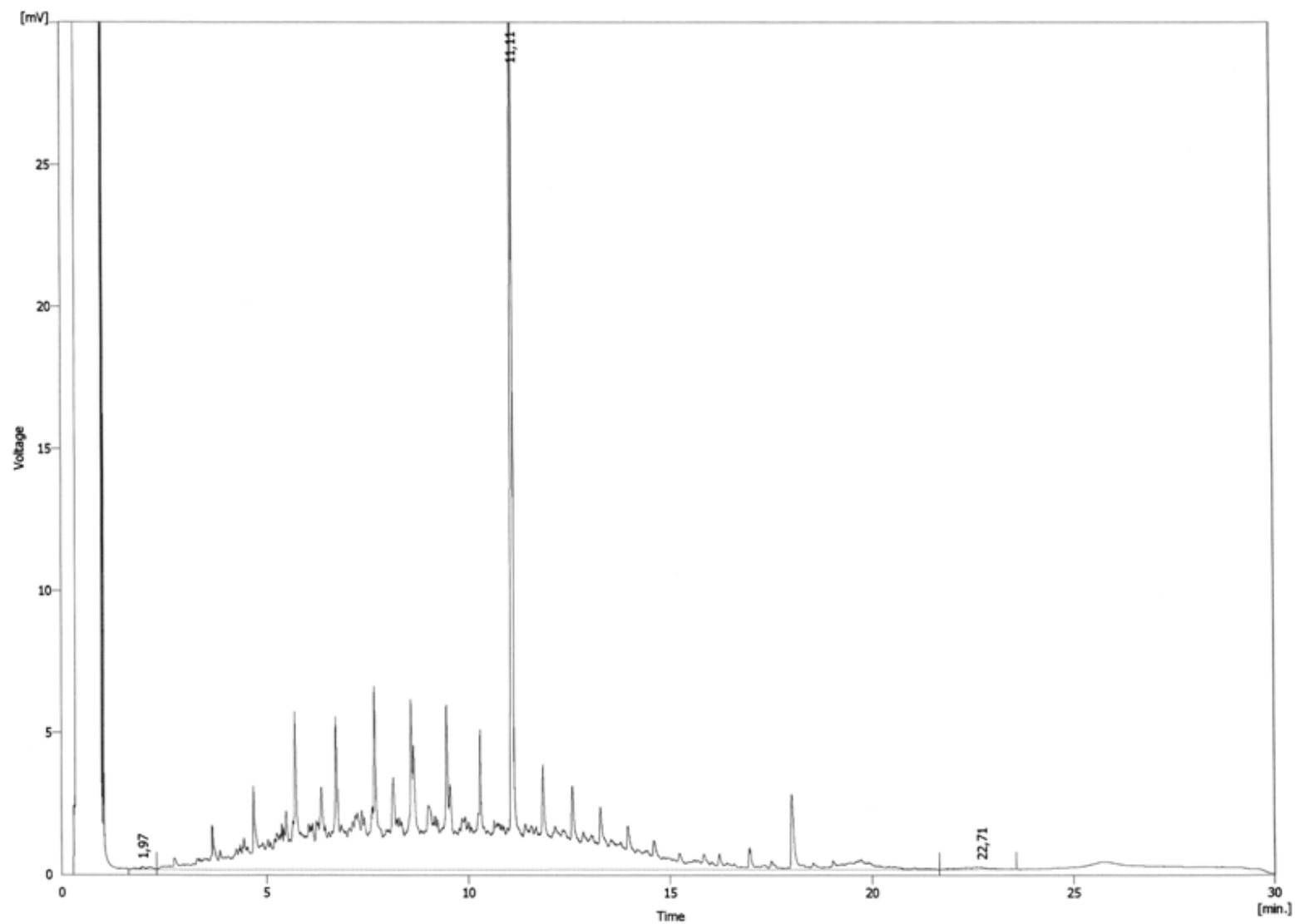


Figura E4: Cromatograma de um óleo de soja bruto contaminado com hidrocarbonetos alifáticos saturados de origem mineral, com cadeias curtas.

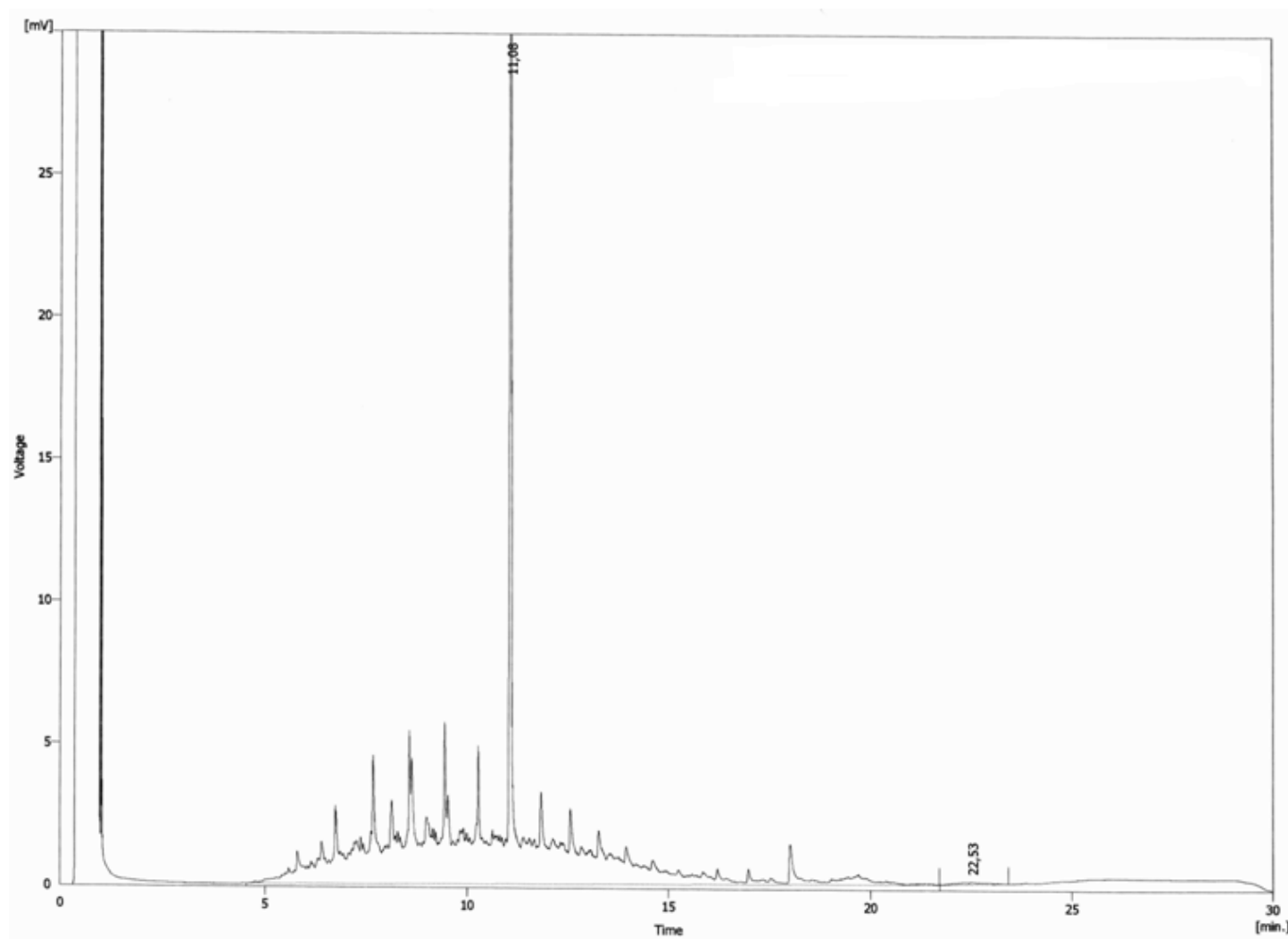


Figura E5: Cromatograma referente ao duplicado da análise mencionada na Figura E4, em que se verifica o desaparecimento da zona inicial da banda larga correspondente a óleo mineral.

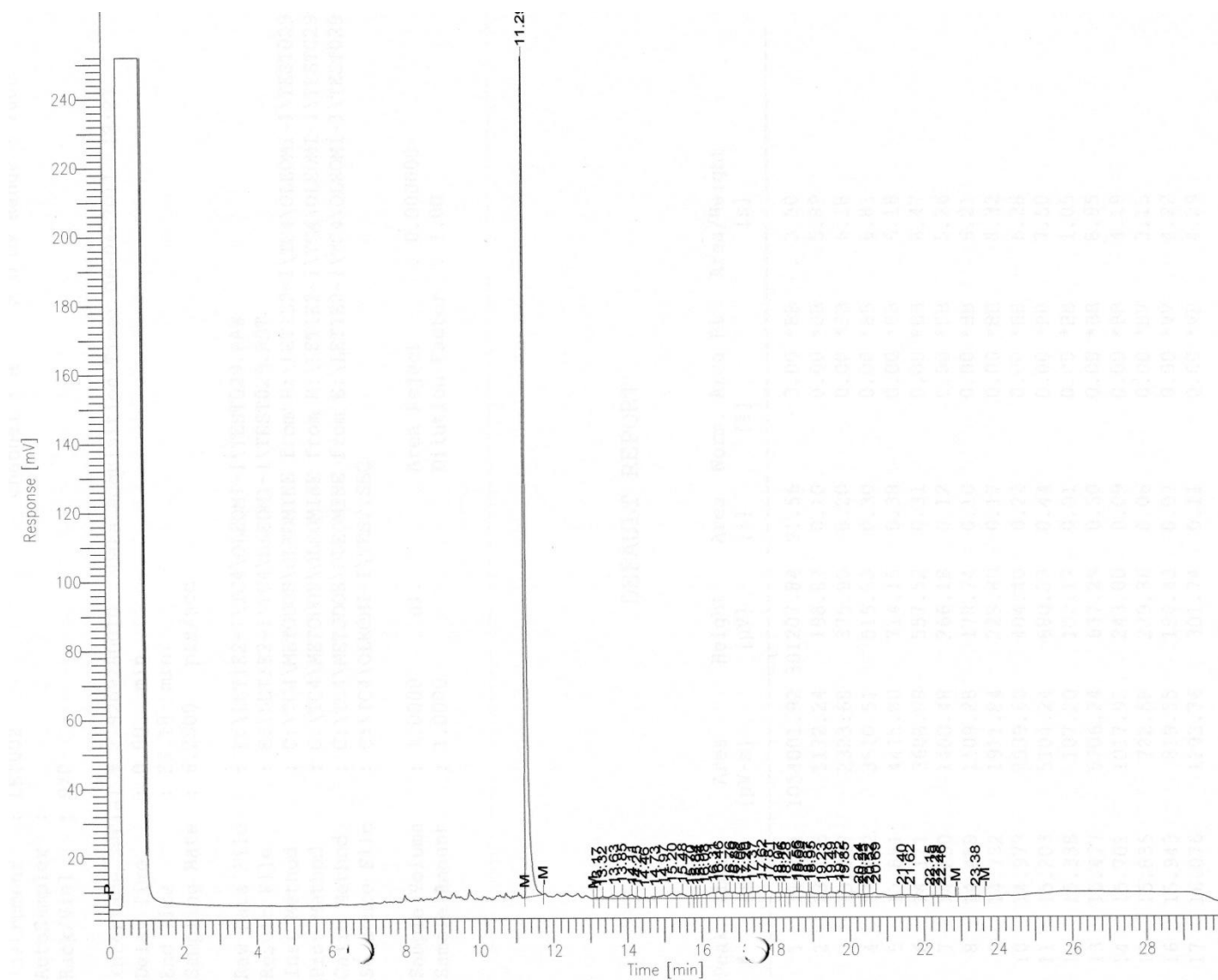


Figura E6: Cromatograma de um padrão de 15 mg.kg^{-1} obtido recorrendo ao software *Turbochrom Navigator*.

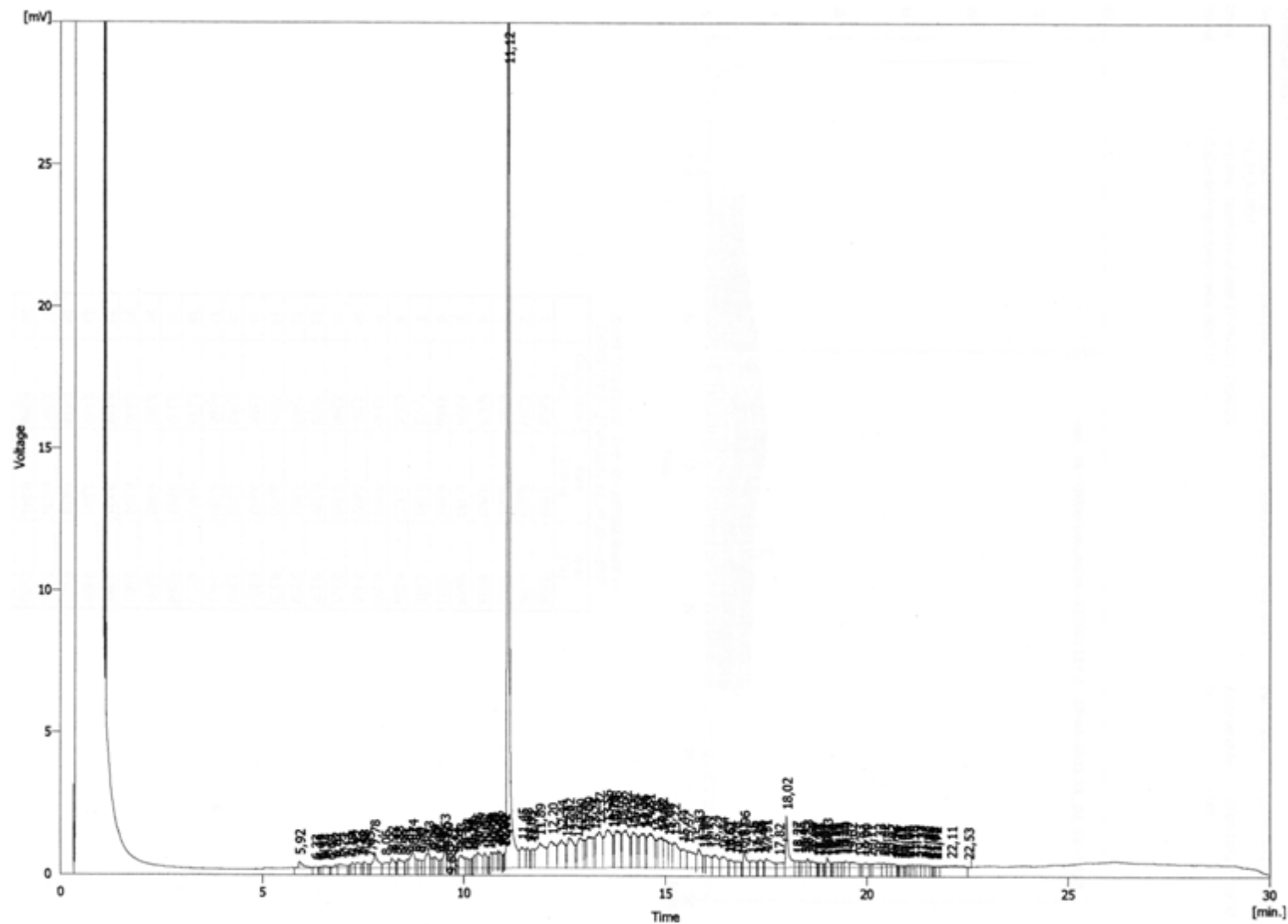


Figura E7: Cromatograma obtido para uma amostra de óleo de soja bruto, onde o padrão interno aparece na mesma zona da banda larga correspondente a óleo mineral – integração para a obtenção de hidrocarbonetos alifáticos saturados totais.

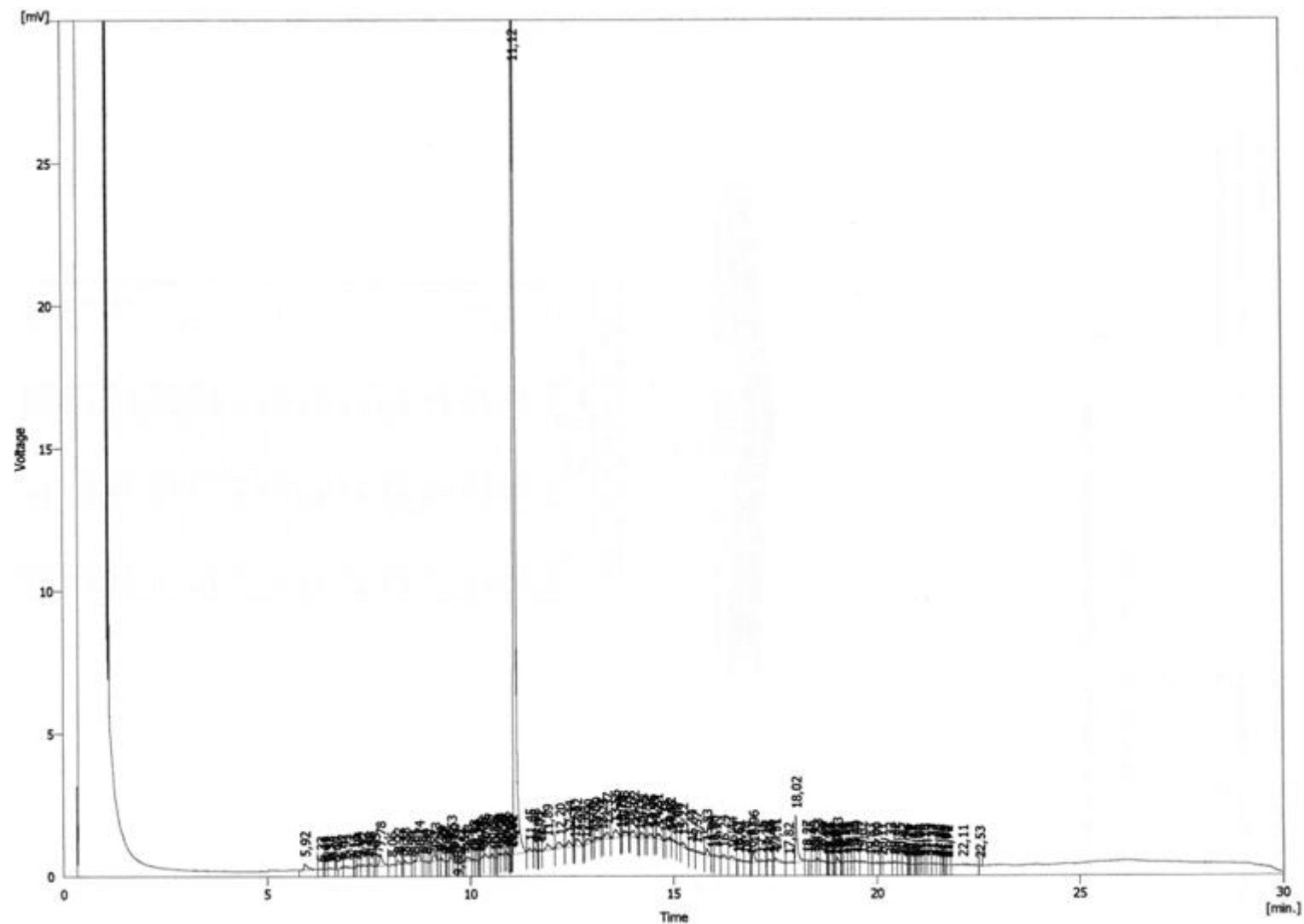


Figura E8: Cromatograma obtido para uma amostra de óleo de soja bruto, onde o padrão interno aparece na mesma zona da banda larga correspondente a óleo mineral – integração pico a pico para a obtenção dos hidrocarbonetos alifáticos saturados normais num óleo.

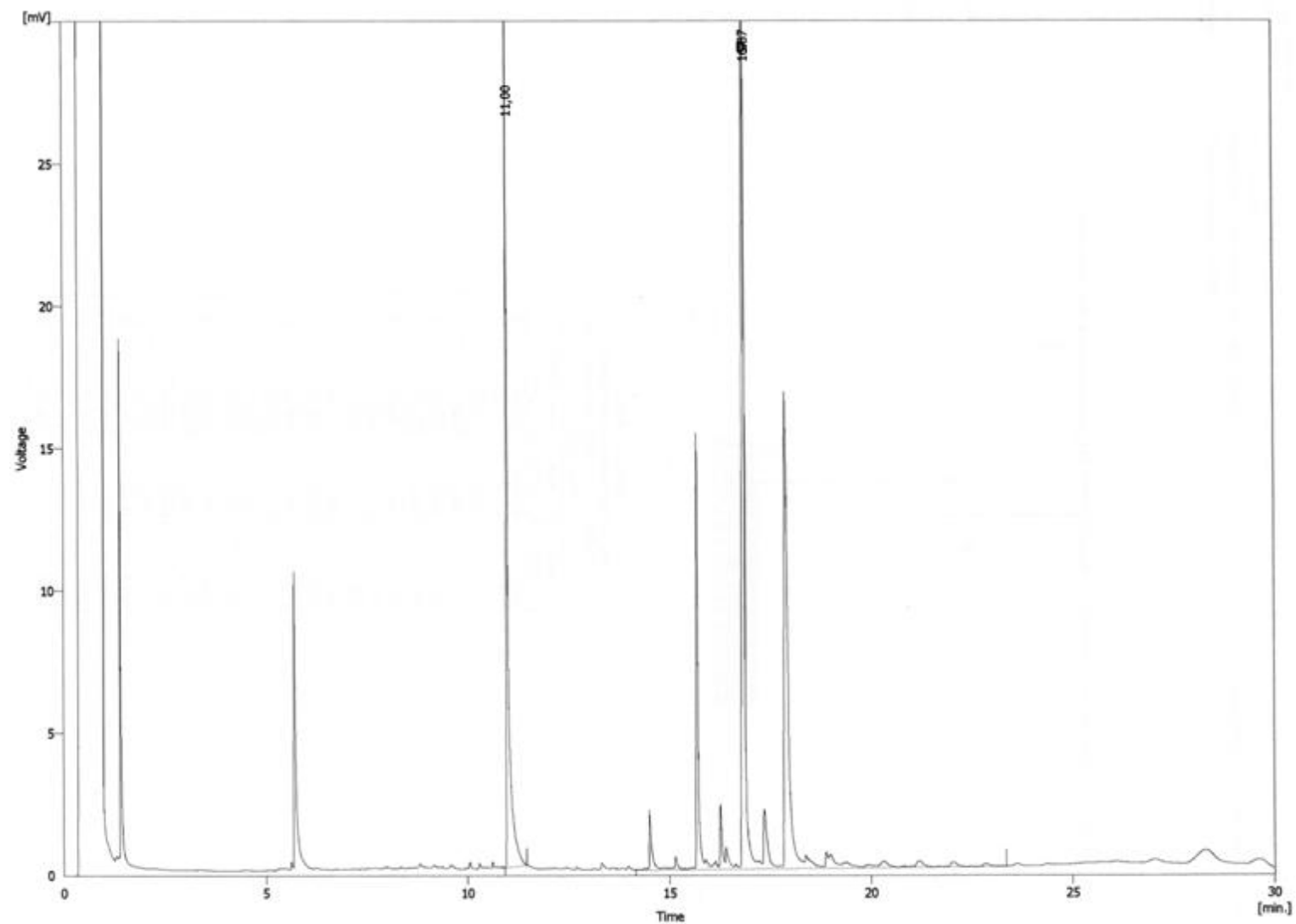


Figura E9: Cromatograma referente a uma amostra de óleo de girassol bruto, analisada pelo método interno validado neste trabalho.

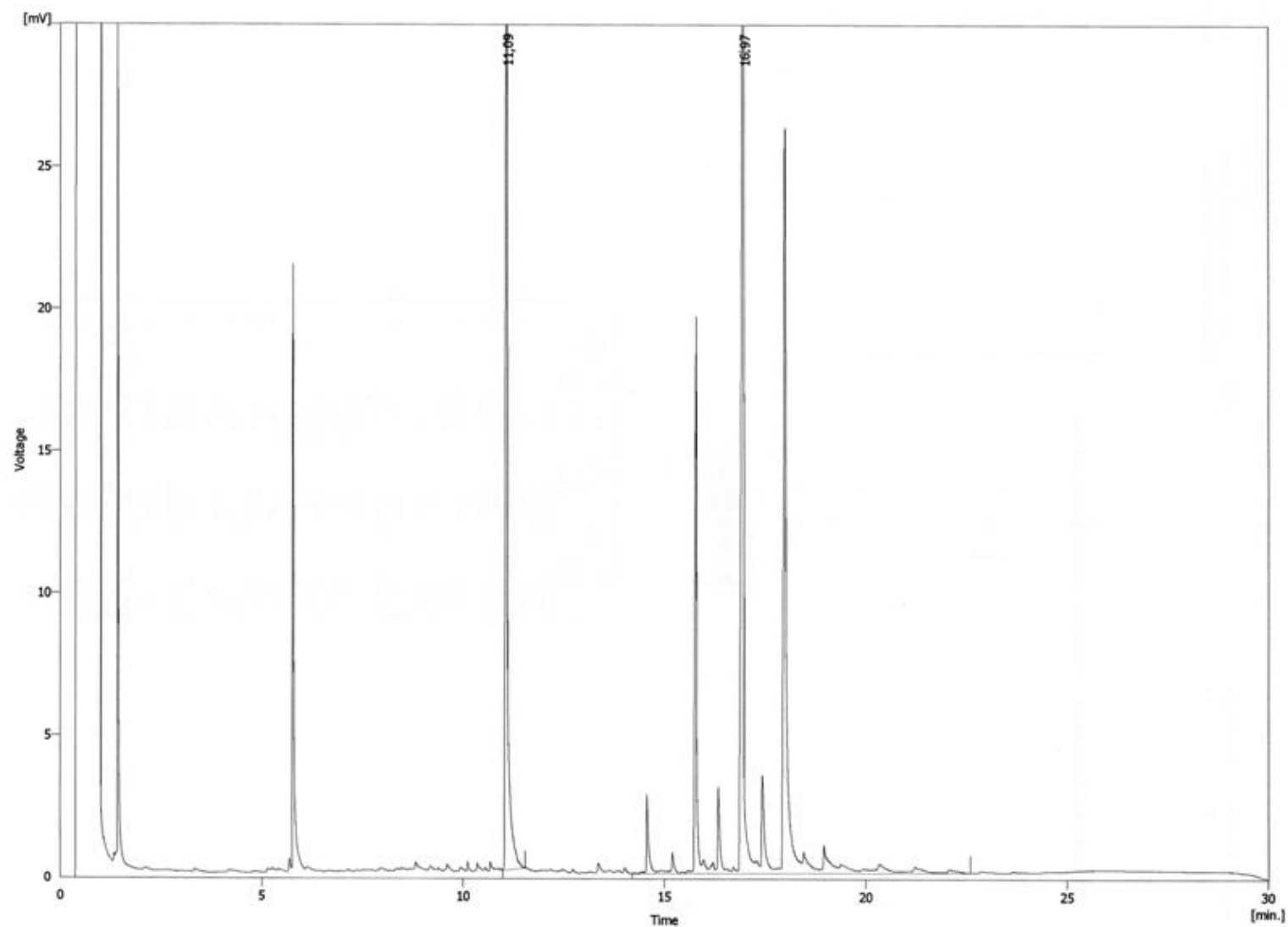


Figura E10: Cromatograma referente à amostra mencionada na Figura E9, analisada pelo método apresentado na Norma ISO.